

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**INDUZIERTER PLURIPOTENTER STAMMZELLEN - ENTWICKLUNG
PATIENTENSPEZIFISCHER ZELLINIEN ALS MODELLSYSTEME
ZUR ERFORSCHUNG VON ERKRANKUNGEN DES
RETINALEN PIGMENTEPITHEL**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stephanie Zimmermann

2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**INDUZIERTES PLURIPOTENTES STAMMZELLEN - ENTWICKLUNG
PATIENTENSPEZIFISCHER ZELLINIEN ALS MODELLSYSTEME
ZUR ERFORSCHUNG VON ERKRANKUNGEN DES
RETINALEN PIGMENTEPITHEL**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stephanie Zimmermann

2016

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Charalampos Aslanidis
Tag der mündlichen Prüfung:	14.10.2016

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	7
2. Einleitung.....	9
2.1. <i>Das retinale Pigmentepithel (RPE)</i>	9
2.1.1. Anatomie und Physiologie des RPE.....	9
2.1.2. Erkrankungen des RPE.....	12
2.1.3. Molekulare Grundlagen der Bestrophinopathien, <i>BEST1</i>	15
2.1.4. Funktionelle Analysen des Proteins Bestrophin-1 (= BEST1).....	16
2.2. <i>Stammzellen als ein neuer Ansatz zur funktionellen Analyse von Krankheitsgenen.</i>	17
2.3. <i>Ziele der Arbeit.....</i>	19
3. Material.....	20
3.1. <i>Ethische Standards</i>	20
3.2. <i>Verwendete Zelllinien</i>	20
3.3. <i>Enzyme.....</i>	22
3.4. <i>Antikörper.....</i>	22
3.5. <i>Primerlisten</i>	23
3.6. <i>Kit-Systeme</i>	24
3.7. <i>Molekularmassenstandard.....</i>	25
3.8. <i>Chemikalien.....</i>	25
3.9. <i>Medien, Puffer und Lösungen.....</i>	27
3.10. <i>Kulturmedien</i>	29
3.11. <i>Verbrauchsmaterial.....</i>	32
3.12. <i>Geräte</i>	33
3.13. <i>Software.....</i>	34
4. Methoden	35
4.1. <i>Zellisolierung und Kultivierung.....</i>	35
4.1.1. Gewinnung adulter humaner dermaler Fibroblasten.....	35
4.1.2. Reprogrammierung der Fibroblasten zu hiPSCs.....	36

4.1.3.	Kultivierung der hiPSCs.....	38
4.1.4.	<i>In vitro</i> -Differenzierung der hiPSCs zu hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen.....	39
4.1.5.	Kultivierung der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen.....	41
4.1.6.	Zeitlicher Überblick der vollständigen Generierung einer hiPSC abgeleiteten RPE-Zelllinie	41
4.2.	<i>Karyotypisierung</i>	42
4.3.	<i>RNA-basierte molekularbiologische Methoden</i>	43
4.3.1.	RNA-Isolation	43
4.3.2.	cDNA Synthese mittels Reverser Transkription	43
4.3.3.	Kontroll-PCR	43
4.4.	<i>cDNA-und DNA-basierte molekularbiologische Methoden</i>	44
4.4.1.	Primerdesign.....	44
4.4.2.	Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	44
4.4.3.	Analytische Agarosegelelektrophorese	45
4.4.4.	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	46
4.4.5.	Sequenzierung	46
4.5.	<i>Immunfluoreszenzfärbungen</i>	50
4.5.1.	hiPSCs	50
4.5.2.	hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen	51
4.6.	<i>Bestimmung des Transepithelialen Widerstandes (TER)</i>	52
4.7.	<i>Fütterungsexperimente mit Photorezeptoraußensegmenten (POS)</i>	52
4.7.1.	Gewinnung von POS	52
4.7.2.	Fluoreszenzmarkierung der POS.....	53
4.7.3.	Fütterung der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen mit POS.....	53
4.8.	<i>Rasterelektronenmikroskopie (REM)</i>	54
5.	Ergebnisse	56
5.1.	<i>Auswahl geeigneter Zellspender</i>	56
5.2.	<i>Isolierung und Kultivierung humaner dermalen Fibroblasten</i>	58
5.3.	<i>Reprogrammierung der Fibroblasten zu hiPSCs</i>	58
5.4.	<i>Kultivierung der hiPSCs</i>	59
5.5.	<i>Charakterisierung der hiPSCs</i>	60
5.5.1.	Mutationsnachweis.....	60
5.5.2.	Karyotypisierung.....	61
5.5.3.	RNA-Expressionsprofil.....	61
5.5.4.	Proteinexpressionsprofil.....	63

5.6.	<i>In vitro-Differenzierung</i>	65
5.6.1.	Protokoll nach Zhu, Carido et al. (2013).....	65
5.6.2.	Protokoll nach Krohne, Westenskow et. al. (2012).....	67
5.7.	<i>Charakterisierung von hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen</i>	69
5.7.1.	RNA-Expressionsprofil.....	69
5.7.2.	Proteinexpressionsprofil.....	70
5.7.3.	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	71
5.7.4.	Transepithelialer Widerstand	73
5.7.5.	Fütterungsexperimente mit Photorezeptoraußensegmenten (POS).....	73
5.7.6.	Kryokonservierung.....	75
5.7.7.	Vergleich von hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen mit normalem und mutiertem <i>BEST1</i>	76
6.	Diskussion	78
7.	Literaturverzeichnis	91
8.	Anhang	98
8.1.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	98
8.2.	<i>Publikationen</i>	100
8.3.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	101
8.4.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	102
8.5.	<i>Danksagung</i>	103

1. Zusammenfassung

Neben multifaktoriell bedingten Erkrankungen des Retinalen Pigmentepithels (RPE), wie der altersbedingten Makuladegeneration, die in Deutschland die häufigste und weltweit eine der Hauptursachen von Erblindungen im Erwachsenenalter darstellt [1, 2], führen auch eine Reihe monogenetisch bedingter Erkrankungen des RPE zu einem progredienten Verlust der Sehkraft. Bis dato gibt es nur begrenzte therapeutische Optionen, da die molekulare Pathogenese dieser Erkrankungen oft noch unklar ist. Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) gelten inzwischen als vielversprechende Möglichkeit *in-vitro* Modelle von Erkrankungen des RPE zu generieren, um die zu Grunde liegenden Ursachen näher beleuchten zu können.

Die im Folgenden beschriebene Studie lieferte als Basisprojekt wichtige Erkenntnisse für eine Arbeitsgruppe, die sich am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg mit der Erforschung von hiPSCs und daraus abgeleiteten RPE-Zellen beschäftigt. Ziel der Arbeit war in erster Linie die Etablierung einer zuverlässigen Methode zur Erzeugung unversehrter hiPSC-abgeleiteter RPE-Zelllinien sowie deren ausführliche Charakterisierung. Es konnte die erfolgreiche Reprogrammierung adulter humaner dermaler Fibroblasten zu hiPSCs und deren Differenzierung in reines, passagierbares RPE gezeigt werden. Die so erhaltenen Zellen waren sowohl strukturell als auch funktionell nativen RPE-Zellen sehr ähnlich.

Zunächst wurden hierfür Fibroblastenstämme aus Hautbiopsien von Kontrollpersonen und Patienten mit Mutationen im Bestrophin-1 (*BEST1*)-Gen gewonnen, welche für die autosomal dominante vitelliforme Makuladystrophie verantwortlich sind. Durch Transduktion mittels polyzystronischem Lentivirus und Überexpression der Faktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *L-Myc* wurden die Fibroblasten zu hiPSCs reprogrammiert. Diese zeigten eine ähnliche Morphologie wie embryonale Stammzellen, wiesen auf RNA- und Proteinebene ein charakteristisches Stammzellmarkerprofil auf und besaßen chromosomale Integrität. Die nachfolgende Differenzierung lieferte hiPSC-abgeleitetes RPE, das einen pigmentierten, hexagonalen Zellrasen bildete. Es war sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene mit nativem RPE vergleichbar. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten hexagonale Zellen mit typischen, apikalen Mikrovilli, während die hohen, transepithelialen Widerstände für Zellintegrität sowie die Ausbildung eines funktionsfähigen, apikalen Tight-Junction Komplexes sprachen. Zudem bestätigten Fütterungsexperimente mit Photorezeptoraußensegmenten

(POS) eine intakte Phagozytosefähigkeit des hiPSC-abgeleiteten RPE. Darüber hinaus gelang es in dieser Arbeit sowie in späteren Experimenten an den hier erzeugten Zellen nachzuweisen, dass kryokonserviertes hiPSC-abgeleitetes RPE seine strukturelle und funktionelle Unversehrtheit weitgehend beibehält. Dies ist vor allem für die Generierung patienten- und krankheitsspezifischer Zellbanken von großer Bedeutung.

Es konnte somit gezeigt werden, dass dermale Fibroblasten als verlässliche Quelle zur Erzeugung von hiPSC-abgeleitetem RPE dienen, das in seinen strukturellen und funktionellen Eigenschaften humanem RPE gleicht.

Weiterhin lieferten Immunzytofärbungen die Erkenntnis, dass das Transmembranprotein BEST1 bei den hier generierten mutanten hiPSC-abgeleiteten RPE-Reihen im Vergleich zu Kontrolllinien nicht weitgehend an der basolateralen Plasmamembran, sondern zum großen Teil auch diffus im Zytoplasma der Zellen zu finden war. Hier wurde bereits früher ein Zusammenhang mit der Entstehung der Bestrophinopathien diskutiert [3].

Schließlich half das in dieser Arbeit erzeugte hiPSC-abgeleitete RPE in späteren Versuchen neue Erkenntnisse über die Rolle des Transmembranproteins BEST1 als volumenregulierter Chloridkanal und entscheidender Bestandteil volumenregulierter Anionenkanäle (volume-regulated anion channels, VRACs) [4] zu gewinnen und wird in Form kryokonservierter Zellbanken auch weiterhin für Versuche zur Verfügung stehen.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits in Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5] und Milenkovic, Brandl et al. (2015) [4] veröffentlicht. Während die Bedingungen für eine zuverlässige Differenzierung der hiPSCs zu daraus abgeleiteten RPE Zellen am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg erst im Rahmen dieser Arbeit analysiert und festgelegt werden mussten, war ein verlässliches Protokoll für die Reprogrammierung von Fibroblasten zu hiPSCs dort bereits im Vorfeld etabliert worden.

2. Einleitung

2.1. Das retinale Pigmentepithel (RPE)

2.1.1. Anatomie und Physiologie des RPE

Das retinale Pigmentepithel (RPE) repräsentiert einen unmittelbar der Netzhaut aufliegenden Monolayer und ist als strukturell einzigartiges Gewebe für einen intakten Visus unabdingbar. Es liegt zwischen Choroidea (Aderhaut) und neurosensorischer Retina und bildet zusammen mit Choriocapillaris und Photorezeptoren ein funktionelles Synzytium. An seinem apikalen Pol stülpt es sich mit seinen langen, fingerförmigen Fortsätzen direkt zwischen die lichtempfindlichen Außensegmente der Photorezeptoren (**Abb. 1**). Diese sogenannten Mikrovilli ermöglichen dem RPE eine bis zu 30-fache Oberflächenvergrößerung [6]. An seiner basolateralen Seite ist es dagegen fest mit der Bruch'schen Membran verbunden, die eine Grenzmembran zwischen RPE und fenestriertem Endothel der Aderhaut darstellt. Morphologisch handelt es sich um einschichtiges Epithel neuroektodermalen Ursprungs, welches einen dichten Rasen gut strukturierter, pigmentierter, hexagonaler Zellen ausbildet. Während die Dichte des RPEs in der Peripherie der Netzhaut mit zunehmendem Alter abnimmt, bleibt sie im Bereich der Fovea auch bis ins hohe Alter weitgehend konstant. Dies ist im Sinne einer Kompensation des Zellverlusts vermutlich auf ein Einwandern peripherer RPE-Zellen zurückzuführen [6].

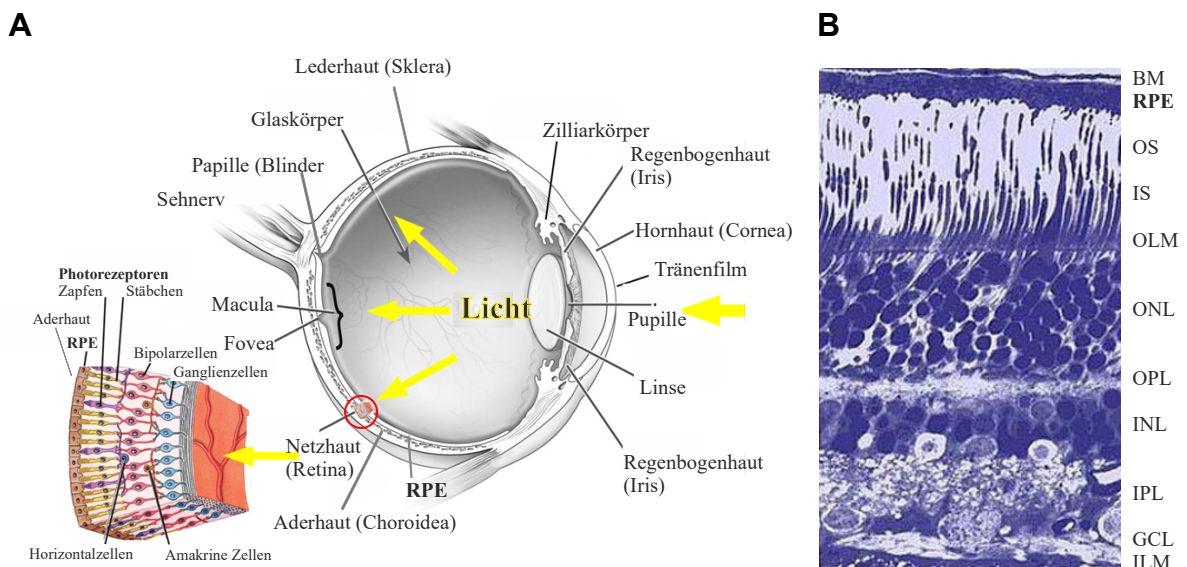


Abb. 1: Schematische Darstellung des menschlichen Auges sowie Überblick und Aufbau der retinalen Schichten. (A) Sagittaler Querschnitt durch das menschliche Auge mit Illustrierung seiner wichtigsten Strukturen und

Überblick über die wichtigsten Zellen der Retina. Abbildung wurde modifiziert nach <http://www.intechopen.com/source/html/26714/media/image1.png> [28.03.2016]. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines vertikalen Schnitts durch den peripheren Bereich der humanen Retina. BM = Bruch'sche Membran; RPE = retinales Pigmentepithel; OS = outer segments (Außensegmente); IS = inner segments (Innensegmente); OLM = outer limiting membrane (äußere Grenzmembran) ONL = outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL = outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht); INL = inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL = inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL = ganglion cell layer (Ganglienzellschicht); ILM = inner limiting membrane (innere Grenzmembran). Abbildung modifiziert nach <http://webvision.umh.es/webvision/imageswv/huperi.jpeg> [28.03.2016].

Zu seinen vielfältigen Aufgaben zählen neben der Absorption von Streulicht durch das in ihm enthaltene Pigment unter anderem die Entsorgung abgestorbener Photorezeptor Außensegmente (photoreceptor outer segments = POS), das Recycling von Vitamin A (Retinol), der Transport von Wasser, Ionen und metabolischen Abbauprodukten aus dem subretinalen Spalt in das choriokapilläre Blut sowie die Ernährung und der Schutz des umliegenden Gewebes [7-11].

Mit Hilfe seines apikalen Verbindungskomplexes aus *tight junctions*, *adherens junctions* und *gap junctions* hält das RPE zudem die hierfür benötigte Polarität aufrecht. Im Sinne einer physikalischen Barriere zwischen Choroidea und subretinalem Raum verhindert es intermembranöse Diffusion [6] und fungiert somit als äußerer Teil der Blut-Retina-Schranke.

Durch die Expression von Aquaporin 1, einem integralen Membranprotein, ist das RPE in der Lage stündlich mehrere Mikroliter Flüssigkeit aus dem subretinalen Spalt in das Blut abzutransportieren [6]. Außerdem ist es durch den kontinuierlichen Transport von Ionen für die Aufrechterhaltung der Homöostase und des pH im subretinalen Spalt verantwortlich, was für die Erregbarkeit der Photorezeptoren von entscheidender Bedeutung ist [12]. Mittels Gliafunktion kann das RPE so schnelle Elektrolytschwankungen innerhalb des subretinalen Raums, die beispielsweise bei Lichtreizen entstehen, kurzfristig ausgleichen [11].

Daneben ist es für den Sinneszell-Metabolismus unentbehrlich, da es Glucose und Fettsäuren aus dem Blut aufnimmt und sie in Richtung Netzhaut befördert, wo sie den angrenzenden Photorezeptoren zur Verfügung gestellt werden [13, 14].

Außerdem spielt das RPE auch eine unmittelbare Rolle bei der optischen Informationsübermittlung, indem es das beim Sehvorgang anfallende *all-trans*-Retinaldehyd zu *11-cis*-Retinaldehyd isomerisiert und es wieder in den visuellen Kreislauf einspeist, wozu die Photo-

rezeptoren selbst nicht in der Lage sind [15]. Dies setzt die apikale Phagozytose und Degradation von Scheibchenmembranen alter POS voraus [16, 17], die hohe Konzentrationen an freien Radikalen sowie durch Photonen degenerierte Proteine und Lipide aufweisen [18, 19]. Sie werden im RPE verstoffwechselt und aufbereitet, sodass wichtige Moleküle prozessiert und wieder an die Photorezeptoren zurückgegeben werden können [11]. Dabei unterliegt der Vorgang einer streng regulierten zirkadianen Rhythmik [10, 18, 20], die ihren Höhepunkt bereits bei Tagesanbruch mit dem Einfall der ersten Lichtstrahlen auf der Netzhaut erreicht [20-22]. Berechnungen zufolge vermag jede einzelne RPE-Zelle im Laufe eines Menschenlebens, also einem Zeitraum von etwa 80 Jahren, mehrere 100 Millionen Scheibchenmembranen aufzunehmen und weiterzuverarbeiten [6]. Darüber hinaus können sich bei ausgedehnten Netzhautschäden einzelne Zellen aus ihrem Epithelverband lösen, um zugrunde gegangenes Gewebe zu phagozytieren [11]. Insgesamt wird das RPE somit zu einem der stoffwechselaktivsten Gewebe des gesamten menschlichen Organismus gezählt.

Seine Bedeutung zeigt sich auch im Schutz des umliegenden Zellgewebes. Durch eine Vielzahl von Pigmenten, wie das in den Melanosomen gebildete Melanin [23], aber auch durch die Expression von Ceruloplasmin und Hephæstin [6] ist es in der Lage, den durch die Energie des von der Linse auf die Netzhaut gebündelten Lichts ausgelösten oxidativen Stress innerhalb der Zellen zu reduzieren [23].

Außerdem exprimiert das RPE immunsuppressive Faktoren, die durch eine Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung zur Wahrung der Sonderstellung des Auges bei der Immunabwehr beitragen [24]. Daneben sezerniert das RPE auch Wachstumsfaktoren, zu denen in erster Linie bFGF (basic fibroblast growth factor) [25] und VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) zählen, die sowohl für die Sinneszellschicht als auch das Endothel der Choriocapillaris essentiell sind [26].

Insgesamt vereint das RPE durch seine vielen, verschiedenen Aufgabenbereiche also nicht nur typische Epithel- und Pigmentepithelfunktionen, sondern besitzt zudem Fähigkeiten, die Gliazellen und Makrophagen zugeschrieben werden können (**Abb. 2**).

Somit ist die Unversehrtheit des RPE unabdingbar für die Aufrechterhaltung der visuellen Funktion und nicht nur im Bereich der Makula (Macula lutea = gelber Fleck), wo die Photorezeptoren die größte Dichte erreichen, essentiell für die Wahrung des scharfen Sehens.

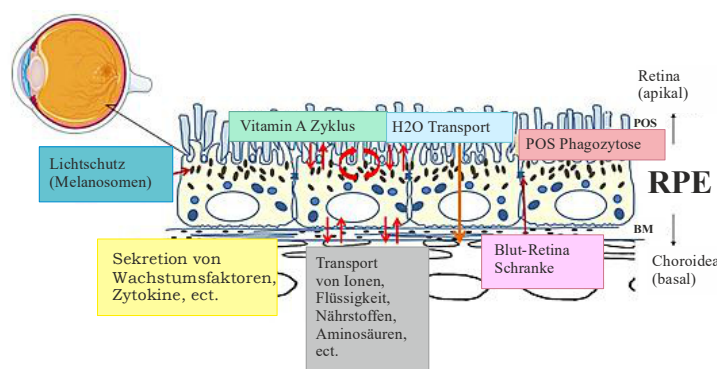


Abb. 2: Schematischer Überblick über die Funktionen des RPE. Diese stellen in erster Linie die Absorption von Streulicht („Lichtschutz“), die Aufrechterhaltung des visuellen Kreislaufs („Vitamin A Zyklus“), diverse Transportvorgänge (Ionen, Flüssigkeiten, Nährstoffe, H₂O, ect.), die Ausbildung der Blut-Retina

Schranke sowie die Phagozytose und Prozessierung alter Scheibchenmembranen von Photorezeptoraußensegmenten (POS) dar. Abbildung abgeändert nach https://www.bmo.uni-luebeck.de/fileadmin/_processed_/csm_RPE_functions-Bild1_e699a521ed [28.03.2016].

Da es sich bei der RPE Zellschicht um postmitotisches Gewebe handelt, können Funktionsstörungen schwerwiegende, teils unumkehrbare Visusminderungen nach sich ziehen. Der Untergang des RPE kann schließlich zur vollständigen Erblindung führen. Für Betroffene bedeutet das einen frühzeitigen Verlust der Unabhängigkeit und hierdurch eine unmittelbare, drastische Einschränkung ihrer Lebensqualität.

2.1.2. Erkrankungen des RPE

Ophthalmologische Erkrankungen des Photorezeptor-/retinalen Pigmentepithel (RPE)-/Choroid-Komplexes stellen eine genetisch heterogene Gruppe dar und manifestieren sich in der Netzhaut sowohl zentral, wie bei den Makuladystrophien, als auch peripher. Neben komplexen Erkrankungen, wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), die die häufigste Ursache für Erblindung in der westlichen Welt darstellt [27, 28], gehören dazu auch monogenetische Erkrankungen wie die Bestrophinopathien. Letztere umfassen mindestens drei eigenständige Krankheitsentitäten, zu denen die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD) (= Morbus Best) [29, 30], die autosomal dominante Vitreoretinchoroidopathie (ADVIRC) [31] und die autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB) [32] gehören. All diese Erkrankungen führen über einen Funktionsverlust des RPE letztlich zu unterschiedlich ausgeprägten Visuseinschränkungen. Sie unterscheiden sich in erster Linie bezüglich ihrer Vererbung, des Patientenalters bei Erstmanifestation sowie ihrer Lokalisation und können durch elektrodiagnostische Untersuchungen [z.B. Elektrookulogramm (EOG) und Elektroretinogramm (ERG)] genauer spezifiziert werden [33]. Die klinischen Ausprägungen sind im Folgenden näher beschrieben.

Morbus Best (BVMD) und adulte vitelliforme Makuladystrophie (AVMD)

Zu einer der ersten Netzhauterkrankungen, die hereditären Veränderungen des RPE zugeordnet werden konnten, gehört der Morbus Best. Diese 1905 erstmals vom Gießener Augenarzt Friedrich Best beschriebene und später nach ihm benannte autosomal dominante Erkrankung führt zu atrophischen Veränderungen des RPE sowie konsekutiv der darüber liegenden zentralen Netzhaut. Erste Symptome treten häufig bereits vor dem 20. Lebensjahr in Erscheinung, können sich aber auch erst wesentlich später, beispielsweise in der sechsten Lebensdekade, manifestieren [34]. Dann wird die Erkrankung auch als „adulte vitelliforme Makuladystrophie“ (AVMD) bezeichnet. Da die Hauptunterschiede zwischen BVMD und AVMD in einem späteren Krankheitsausbruch, einer langsameren Progression und einem milderen Krankheitsverlauf liegen [35, 36], wertet man die AVMD inzwischen als Unterform der bekannteren BVMD im Sinne einer late-onset Variante [33].

Während AVMD funduskopisch primär durch zentrale Drusen sowie Pigmentepithelverschiebungen in Erscheinung tritt, wird bei BVMD meist die klassische Abfolge verschiedener Stadien beobachtet.

In der Regel beginnt BVMD mit Farbsehstörungen, die von Veränderungen im EOG begleitet werden. Zu diesem Zeitpunkt ist der Fundus meist noch unauffällig, sodass dies als „prävitelliformes“ Stadium bezeichnet wird.

Erst im Verlauf der Erkrankung kommt es zu charakteristischen, ophthalmoskopisch sichtbaren Fundusveränderungen, dem „vitelliformen“ und nachfolgend dem „scrambled egg“-Stadium. Die Bezeichnung „vitelliforme Makuladystrophie“ verdankt die Erkrankung somit den gelben, eidotterförmigen (vitelliformen) Läsionen, die im Bereich der Makula durch Lipofuszinablagerungen zwischen sensorischer Retina und RPE auf Höhe der Bruch'schen Membran entstehen. Diese Ablagerungen stellen in erster Linie beim Sehvorgang anfallende Abfallprodukte, wie A2E, dar [35]. Ihre Akkumulation geht auf eine Funktionseinschränkung des RPE zurück, das bei dieser Krankheitsform mit zunehmendem Alter nicht mehr ausreichend in der Lage ist, anfallende Stoffwechselprodukte abzubauen. Trotz deutlich sichtbarem, ophthalmoskopischem Befund ist der Visus in diesem Stadium meist kaum eingeschränkt.

Im Verlauf des chronisch progredienten Morbus Best kommt es zu einem Umbau der gelblichen Substanz, von einer anfänglichen Verflüssigung mit Spiegelbildung (Pseudohypopyon)

bis hin zur Absorption des verflüssigten Lipofuszin durch das erkrankte RPE (vitelliruptives Stadium = „Rührei-Stadium“). Dies führt durch eine Überladung mit toxischen Stoffwechselprodukten schließlich zur Atrophie des RPE [35]. Da hierdurch im Bereich der Makula die strukturelle Integrität zwischen Aderhaut, RPE und Photorezeptoren beeinträchtigt wird, kommt es in Folge zu einem Untergang der Photorezeptoren und seltener zu choroidalen Neovaskularisationen. Insgesamt führt das Krankheitsgeschehen letztlich zu einer Verschlechterung des zentralen Sehvermögens bis hin zur vollständigen Erblindung.

Morbus Best zeigt bei betroffenen Familienmitgliedern oft ein heterogenes Bild mit unterschiedlich stark ausgeprägten Symptomen, wie verstärkter Blendempfindlichkeit, Farbsinnesstörungen, Sehschärfenminderung und zentralem Gesichtsfeldausfall [35]. Da BVMD eine variable Penetranz und einen hohen Grad an Expressivität aufweist, kommt es nicht bei allen Erkrankten zur Ausbildung eines entsprechenden Phänotyps [37].

Als wichtiges diagnostisches Kriterium zeigt sich beim Morbus Best ein stark erniedrigter oder erloschener Hellanstieg im EOG bei unauffälligem ERG [35, 38].

Autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) und MRCS-Syndrom

ADVIRC stellt eine äußerst seltene, langsam fortschreitende Erkrankung des RPE dar. Sie weist einen variablen Phänotyp auf [39, 40] und betrifft vor allem die peripheren Bereiche der Netzhaut [33]. Charakteristisch ist hierbei eine sich vom Äquator nach peripher zur Ora Serata ausbreitende, scharf begrenzte, flächige Hyperpigmentierung. Als ursächlich gelten in erster Linie Veränderungen des RPE und der retinalen Gefäße [41], die zu einer Degeneration des Komplexes aus Glaskörper, Netz- und Aderhaut führen. Im Verlauf kommt es zu weißgelblichen Ablagerungen der Retina, einer Degeneration des Pigmentepithels, Verdichtungen des Glaskörpers, einem Untergang der Blut-Retina Schranke, retinaler Gefäßverengungen, Neovaskularisation und einer Atrophie der Aderhaut [39, 41]. Durch Makulaödeme und Einblutungen in den Glaskörper führt die Erkrankung letztlich zu verschieden stark ausgeprägten Visuseinschränkung [41].

Eine Unterform stellt das äußerst selten auftretende MRCS (microcornea, rod-cone dystrophy, cataract and posterior staphyloma) Syndrom dar, bei dem es durch einen autosomal dominant vererbten Gendefekt zu einer Entwicklungsstörung des Auges und in Folge zu beidseitiger Mikrokornea, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, präsenilem Katarakt und posteriorem Staphylom kommt [42].

Insgesamt reichen die Ausprägungen dieses Krankheitsbildes von sehr milden, langsam progredienten Verläufen [35, 41, 43] bis hin zum angeborenen Nanophthalmos [31].

Autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB)

Bei der ARB zeigen sich morphologisch und funktionell Veränderungen, wie Ablagerungen auf der Retina oder ein reduzierter Hellanstieg im EOG [44], die sich zum Teil mit denen bei BVMD decken [45]. Im Gegensatz zu BVMD und ADVIRC wird diese Erkrankung jedoch autosomal rezessiv vererbt. Sie betrifft primär die periphere Retina [33], es finden sich keine zentralen vitelliformen Läsionen. Neben den klassischen Visuseinschränkungen zeigen Patienten häufig eine hohe Weitsichtigkeit sowie eine abgeflachte Vorderkammer [32, 44]. Auch hier wurde phänotypisch eine große Spannbreite beobachtet.

2.1.3. Molekulare Grundlagen der Bestrophinopathien, *BEST1*

Bestrophinopathien stellen eine Gruppe monogenetisch bedingter Erkrankungen des RPE dar. Sie alle können durch Mutationen in einem einzigen Gen hervorgerufen werden. Dieses Gen wurde 1998 im Rahmen der molekularen Aufklärung des Morbus Best erstmals von einer deutschen und amerikanischen Arbeitsgruppe zeitgleich beschrieben [29, 30] und erhielt später die Bezeichnung „*BEST1*“ (=VMD2) [35].

Bis heute wurden im *BEST1* Gen mehr als 200 ursächliche Mutationen beschrieben [33], bei denen es sich größtenteils um Missense-Mutationen handelt. Eine Aufstellung aller bislang entschlüsselten Sequenz Varianten liefert eine online Datenbank, die vom Institut für Human-genetik der Universität Regensburg kuriert wird:

http://www-huge.uni-regensburg.de/BEST1_database/home.php?select_db=BEST1.

Eine Expression des humanen *BEST1* findet sich in erster Linie im RPE, daneben in meist geringerer Expressionsstärke auch in Hoden, Niere, Gehirn und Rückenmark [29, 30, 35].

Es ist auf Chromosom 11q13 lokalisiert [35, 46], umspannt 15 Kilobasen genomischer DNA und setzt sich aus 11 Exonen zusammen [29, 30, 35]. Seine Expression wird über zwei E-boxen innerhalb der Promotorregion gesteuert, die Transkriptionsfaktoren wie MITF und OTX2 binden können [35, 47-49].

Die Transkription der 11 Exone führt zur Translation des Proteins „Bestrophin-1“ (= BEST1).

2.1.4. Funktionelle Analysen des Proteins Bestrophin-1 (= BEST1)

Bei dem Protein BEST1 handelt es sich um ein 68 kDa großes Transmembranprotein [50], das sich aus insgesamt 585 Aminosäuren zusammensetzt [35, 50-52] und primär in der basolateralen Plasmamembran des RPE zu finden ist [3, 53]. Neben dem ursprünglichen topologischen Modell von Tsunenari, Sun et al. (2003) [52], das davon ausgeht, dass BEST1 über 5 Transmembrandomänen verfügt, postulieren Milenkovic, Rivera et al. (2007) [50] ein Modell mit nur 4 Transmembrandomänen (TMD) (**Abb. 3**), das sich derzeit besser mit dem aktuellen Forschungsstand in Einklang bringen lässt [54]. Der ausschlaggebende Unterschied liegt dabei in einer Annahme über die Lokalisation der Aminosäuren ~199-233 [35], die bei Milenkovic, Rivera et al. (2007) [50] in einer großen Zytoplasmaschleife, bei Tsunenari, Sun et al. [52] dagegen extrazellulär vermutet werden. 2014 konnten Kane Dickson, Pedi et al. [55] mittels Röntgenstrahlen nachweisen, dass der BEST1 Kanal ein Homopolymer bestehend aus 5 Untereinheiten darstellt. Sie fanden eine einzelne Ionen Pore an der zentralen Längsachse des Kanals und stellten fest, dass Ca^{2+} an der großen, zytosolischen Region des Ionenkanals bindet. Sie folgerten, dass eine hydrophobe Verengung innerhalb der Pore ähnlich eines Schleusentors an einer Ca^{2+} -abhängigen Durchlässigkeit für Anionen beteiligt ist [55]. Insgesamt stützten auch ihre Ergebnisse die Annahme über die Membranstruktur von Milenkovic, Rivera et al. (2007) [50] mit nur 4 Transmembrandomänen.

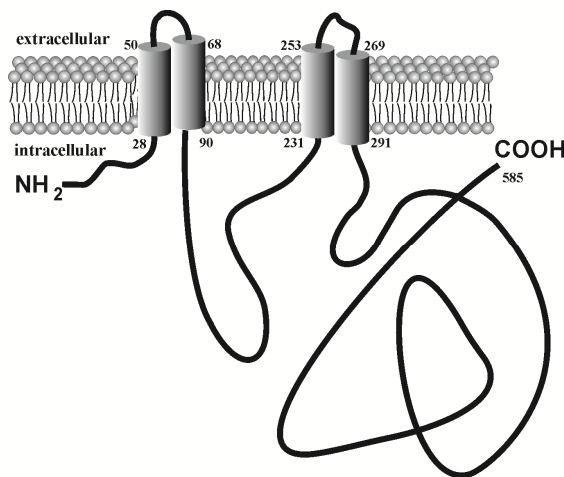


Abb. 3: Postulierte Membrantopologie von BEST1. Model nach Milenkovic, Rivera et al. (2007) [50]. 4 der 6 möglichen TMDs (1, 2, 5 und 6) werden hier als Transmembranabschnitte angesehen, während TMD 3 und 4 die Membran nicht kreuzen, sondern Teil einer großen, relativ hydrophoben Zytoplasmaschleife darstellen. Abbildung aus Milenkovic, Rivera et al. (2007) [50].

Bei Erkrankungen, die mit Mutationen im *BEST1* Gen und somit einer fehlerhaften Expression des BEST1 Proteins einhergehen, kommt es durch funktionsgeschädigtes RPE zum ungenügenden Abbau von POS [56] sowie Ansammlungen subretinaler Flüssigkeiten und autofluoreszenter Abfallprodukte zwischen RPE und Photorezeptoren. Die Akkumulation von toxischem Material führt sowohl zu einem Untergang der Photorezeptoren als auch zur Atrophie des RPE. Dieses muss trotz

Funktionseinschränkung nun immer mehr anfallende Stoffwechselprodukte beseitigen, wodurch es letztlich mit giftigen Abfallstoffen, wie Lipofuszin, überladen wird [57].

Bisher durchgeführte Experimente haben nahegelegt, dass es sich bei dem Protein BEST1 entweder um einen HCO_3^- -Transporter und/oder volumenabhängigen Anionenkanal sowie möglicherweise um einen Ca^{2+} -gesteuerten Cl^- -Ionenkanal und/oder Regulator von Ca^{2+} -Kanälen innerhalb der Plasmamembran handelt [3, 35, 56, 58, 59]. Es zeigte sich außerdem, dass BEST1 vermutlich auch in der Membran von Zellorganellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum, eine wichtige Rolle spielt [53, 56]. Zudem scheint es an intrazellulären Vorgängen, wie lysosomalem Verdau, Phagozytose [60, 61] und Signaltransduktion beteiligt zu sein [35, 61, 62] und die embryonale Entwicklung des Auges zu beeinflussen [63].

In einem 2015 veröffentlichten Paper konnten Milenkovic, Brandl et al. (2015) [4], unter anderem auf Basis der hier generierten Zelllinien, schließlich zeigen, dass es sich bei dem Transmembranprotein BEST1 um einen volumenregulierten Chloridkanal handelt. Dieser gelangt bei Patienten mit Mutationen im *BEST1* Gen nicht mehr ausreichend an die Zellmembran, wodurch die Chlorid-Leitfähigkeit der betroffenen RPE-Zellen stark eingeschränkt ist. Insgesamt sahen Milenkovic, Brandl et al. (2015) [4] in diesem Kanal (BEST1) einen wichtigen Bestandteil volumenregulierter Anionenkanäle (VRACs). Sie folgerten, dass es sich bei VRACs nicht um singuläre, ubiquitär exprimierte Ionenkanäle handelt, sondern dass diese aus verschiedenen Untereinheiten, wie BEST1, bestehen, die zell- und gewebespezifisch unterschiedlich zusammengesetzt sind [4].

2.2. Stammzellen als ein neuer Ansatz zur funktionellen Analyse von Krankheitsgenen

Bislang gestaltete sich die Erforschung des *BEST1* schwierig, da das ursächliche Gen pathologisch zellspezifisch im RPE agiert und entsprechendes Patientenmaterial in der Regel nicht zur Verfügung steht. Auch alternative Studien mit *in vivo* Nager-Tiermodellen lieferten bislang kaum aussagekräftige Ergebnisse, da die Tiere keinen entsprechenden Phänotyp zeigen [4] und die Resultate somit nur unzureichend auf den Menschen übertragbar sind. Ebenso brachte die Expression von *BEST1 in vitro*, beispielsweise in HEK 293 (*human embryonic kidney 293*) oder MDCK II (*Madin-Darby canine kidney II*) Zellen bisher nicht die gewünschten Erkenntnisse. Da solche Zellsysteme *BEST1* nicht endogen exprimieren, muss eine artifizielle Überexpression herbeigeführt werden. Diese kann jedoch für sich genommen

bereits die Ergebnisse beeinflussen. Außerdem speichern HEK 293 Zellen einen großen Teil des überexprimierten BEST1 Proteins intrazellulär, bilden keine polare Zellkultur und machen es durch endogene, LRRC8A-abhängige VRACs unmöglich, zwischen eigenen und durch heterologe *BEST1* Expression hervorgerufenen Ionenströmen zu unterscheiden [4]. Auch MDCK II Zellen, die sonst ein verlässliches, polares Zellkulturmodell darstellen, sind nur bedingt für die funktionelle Analyse von Ionenströmen geeignet, da sie selbst ein breites Spektrum an Ionenkanälen inklusive Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanäle exprimieren [3].

Die 2006 etablierte Methodik [64, 65], für die der Japaner Shinya Yamanaka und der Brite John Gurdon 2012 den Nobelpreis für Medizin erhielten, eröffnete vielversprechende neue Möglichkeiten. Sie ermöglicht es, die Rolle von Krankheitsgenen in den Zellen zu untersuchen, die primär die Pathologie im Patienten exprimieren. Dazu werden Patienteneigene Zellen aus leicht zugänglichem, zellulärem Material, wie beispielsweise adulten menschlichen Fibroblasten, gewonnen, um anschließend durch retrovirale Überexpression der vier Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *L-Myc*, über die Generierung „humaner induzierter pluripotenter Stammzellen“ (hiPSCs) in einen pluripotenten Zustand zurückversetzt zu werden. Dies erlaubt die Generierung großer, krankheits- und patientenspezifischer Stammzellenbanken, die sich prinzipiell in jedes somatische Gewebe des menschlichen Körpers differenzieren lassen [28]. HiPSCs weisen charakteristische Stammzeleigenschaften auf. Sie besitzen spezifische Oberflächenantigene, eine klassische Telomerase-Aktivität, eine Stammzell-spezifische Proliferationsrate und können *in vivo* zur Induzierung von Teratomen führen. Außerdem sind sie in ihrer Morphologie kaum von embryonalen Stammzellen zu unterscheiden [64, 65]. Im Gegensatz zu diesen müssen für ihre Generierung allerdings keine Embryonen geopfert werden, weshalb sie ethisch und moralisch als eher unbedenklich gelten [65].

Gerade das sonst schlecht zugängliche RPE lässt sich mit einer Vielzahl unterschiedlicher Protokolle ausgezeichnet aus hiPSCs differenzieren und weist eine hohe Übereinstimmung mit humanem RPE aus Spendernetzhäuten auf [66-69].

So gewonnene hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen stellen eine unerschöpfliche Quelle von leicht zugänglichem, mutationsspezifischem humanem RPE dar. Auf Grund ihrer großen Ähnlichkeit zu RPE-Zellen aus Spendernetzhäuten sind sie bestens in der Lage, krankheitsspezifische Pathomechanismen *in vitro* widerzuspiegeln. Durch ihre RPE-spezifischen Charakteristika, wie beispielsweise der Expression von *BEST1* auf RNA- und Proteinebene, sind sie auch

hervorragend zur Entwicklung und Erprobung neuer Medikamente und Behandlungsmöglichkeiten geeignet.

Insgesamt scheint ein hiPSC-basiertes *in vitro* RPE Zellkulturmodell derzeit das größte Potential zu besitzen, der molekulare Pathogenese genetisch bedingter Erkrankungen des RPE, wie beispielsweise der Bestrophinopathien, auf den Grund zu gehen.

2.3. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst ein zuverlässiges Protokoll für die erfolgreiche und effiziente Gewinnung patienten- und krankheitsspezifischer hiPSC-abgeleiteter RPE-Linien am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg zu etablieren. Nachfolgend sollen auf der Basis von hiPSC-abgeleitetem RPE dann Funktionen des BEST1 Proteins sowie krankheitsspezifische Veränderungen im zu Grunde liegenden *BEST1* Gen näher beleuchtet werden.

Daher befasst sich das Projekt zunächst mit der Generierung und Evaluierung spezifischer hiPSC-Linien aus Hautstanzen von gesunden Probanden sowie später auch von Patienten mit Bestrophinopathien als typisches Beispiel monogenetischer Erkrankungen des RPE. Diese sollen im Anschluss zu funktionsfähigem hiPSC-abgeleitetem RPE differenziert werden.

Dabei liegt der Schwerpunkt dieser *in vitro* Studie sowohl auf der Analyse geeigneter Differenzierungsprotokolle als auch auf der sorgfältigen Charakterisierung der gewonnen hiPSC- und daraus abgeleiteten RPE-Zelllinien. Es gilt zunächst den Nachweis zu erbringen, dass die reprogrammierten Stammzellen chromosomale Stabilität besitzen und typische Stammzeleigenschaften, wie charakteristische RNA- und Proteinexpressionsprofile, aufweisen. Die aus unversehrten Stammzelllinien differenzierten hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien sollen dann auf den Umfang hin untersucht werden, in welchem sie in ihren typischen Eigenschaften, wie Morphologie, Genexpression oder Funktionalität tatsächlich nativen humanen RPE-Zellen gleichen, um später für die Analyse entsprechender Pathomechanismen von Erkrankungen des RPE zur Verfügung zu stehen. Um zusätzliche strukturelle Erkenntnisse zu erlangen, sollen die Zellen anschließend auch mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht werden.

Abschließend sollen wildtypische und mutante hiPSC-abgeleitete RPE-Linien auf mögliche Unterschiede, wie beispielsweise der Lokalisation des BEST1 Proteins, untersucht und vergleichend gegenübergestellt werden.

3. Material

3.1. Ethische Standards

Ein entsprechender Ethikantrag wurde vor Studienbeginn gestellt und von der zuständigen Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt (Aktennummer: 11-101-0228). Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Standards, die 1964 in der Deklaration von Helsinki sowie ihren späteren Nachträgen festgelegt wurden, durchgeführt. Es lag von jedem einzelnen Studienteilnehmer eine schriftliche Einverständniserklärung nach erfolgter, ausführlicher Aufklärung vor (informed consent).

3.2. Verwendete Zelllinien

Tab. 1: Verwendete Zelllinien. Aufgelistet sind Bezeichnung, Art, Geschlecht / Alter des Probanden, Mutation, Herkunft und Name der etablierenden Person der verwendeten Zelllinien.

Bezeichnung der Zelllinie	Art	Geschlecht/ Alter	Mutation im <i>BEST1</i> Gen	Herkunft der Zelllinien [Name der sie etablierenden Person(en)]
hFib_wt_1	Fibroblast	weiblich/ 26	Wt	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl)
hFib_wt_2	Fibroblast	männlich/ 31	Wt	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl / Stephanie Zimmermann)
hFib_+/Q238R	Fibroblast	männlich/ 71	AVMD <i>BEST1</i> , Exon6, c713A>G (p.Gln238Arg), heterozygot	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl)
hFib_+/A243V	Fibroblast	männlich/ 37	<i>BEST 1</i> , Exon7, c728C>T (p.Ala243Val), heterozygot	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl)
hFib_+/I295del	Fibroblast	männlich/ 19	<i>BEST 1</i> , Exon 8, c884_886delTCA (p.Ile295del), heterozygot	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl / Stephanie Zimmermann)
hiPSC_wt_1	hiPSC	weiblich/ 26	Wt	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl)
hiPSC_wt_2	hiPSC	männlich/ 31	Wt	Institut für Humangenetik (Stephanie Zimmermann)

hiPSC_+/Q238R	hiPSC	männlich/ 71	AVMD, <i>BEST1</i> , Exon6, c713A>G (p.Gln238Arg), heterozygot	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl / Stephanie Zimmermann)
hiPSC_+/A243V	hiPSC	männlich/ 37	BVMD, <i>BEST 1</i> , Exon7, c728C>T (p.Ala243Val), heterozygot	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl / Stephanie Zimmermann)
hiPSC_+/I295del	hiPSC	männlich/ 19	BVMD, <i>BEST 1</i> , Exon 8, c884_886delTCA (p.Ile295del), heterozygot	Institut für Humangenetik (Stephanie Zimmermann)
hiPSC_ZRPE_wt_1	RPE	weiblich/ 26	Wt	Institut für Humangenetik (Stephanie Zimmermann)
hiPSC_RPE_wt_1	RPE	weiblich/ 26	Wt	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl/ Stephanie Zimmermann)
hiPSC_RPE_wt_2	RPE	männlich/ 31	Wt	Institut für Humangenetik (Stephanie Zimmermann)
hiPSC_RPE_+/Q238R	RPE	männlich/ 71	AVMD, <i>BEST1</i> , Exon6, c713A>G (p.Gln238Arg), heterozygot	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl/ Stephanie Zimmermann)
hiPSC_RPE_+/A243V	RPE	männlich/ 37	BVMD, <i>BEST1</i> , Exon7, c728C>T (p.Ala243Val), heterozygot	Institut für Humangenetik (Caroline Brandl / Stephanie Zimmermann)
hiPSC_RPE_+/I295del	RPE	männlich/ 19	BVMD, <i>BEST1</i> , Exon 8, c884_886delTCA (p.Ile295del), heterozygot	Institut für Humangenetik (Stephanie Zimmermann)
hRPE	RPE	-	Wt	Institut für Humangenetik
HEK 293	HEK	-	keine Mutation	Institut für Humangenetik
mouse embryonic feeder cells (iMEFs)	iMEF	-	keine Mutation	Millipore

Abkürzungen: Wt = Wildtyp (keine Mutation im BEST1 Gen); hiPSC = humane induzierte pluripotente Stammzelle; RPE = retinales Pigmentepithel; HEK = human embryonic kidney; iMEF = mouse embryonic feeder cell; - = keine Angabe.

3.3. Enzyme

Tab. 2: Enzyme. Aufgelistet sind Name und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Enzyme	Hersteller
Antarktische Alkalische Phosphatase (AAP)	New England Biolabs (NEB)
Dispace 1 mg/ml	Stemcell Technologies
Exonuklease (Exo I)	USB
Go Taq-Polymerase	Promega
RevertAid™ Reverse Transcriptase	Fermentas
Trypsin/EDTA	Gibco by Life Technologies
TrypLE™ Select (1 x)	Gibco by Life Technologies

3.4. Antikörper

Tab. 3: Primär- und Sekundärantikörper. Aufgelistet sind Name, Hersteller und Verdünnung der in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper (Spezies: α -m = Maus; α -r = Ratte; α -rb = Kaninchen).

Primärer Antikörper	Hersteller 1	Verdünnung 1	Sekundärer Antikörper	Hersteller2	Verdünnung2
OCT4 Monoclonal Antibody (7E7)	Thermo Scientific / Pierce	1:100	Alexa Fluor® 488 (α -m 488)	Invitrogen	1:800
NANOG Monoclonal Antibody (1E6C4)	Thermo Scientific / Pierce	1:250	Alexa Fluor® 488 (α -m 488)	Invitrogen	1:800
SSEA3 Monoclonal Antibody (MC-631)	Thermo Scientific / Pierce	1:500	Alexa Fluor® 594 (α -r 594)	Invitrogen	1:800
Anti-TRA-1-60® Embryonic Stem Cell 200µg	Abcam	1:500	Alexa Fluor® 488 (α -m 488)	Invitrogen	1:800
Bestrophin 1 (BEST1)	Abcam	1:250	Alexa Fluor® 488 (α -m 488)	Invitrogen	1:800
Zonula Occludens-1 (ZO-1)	Zymed	1:500	Alexa Fluor® 594 (α -rb 594)	Invitrogen	1:800
DAPI (4',6-Diamidion-2-Phenylindol)	Invitrogen	1:1000			

3.5. Primerlisten

Tab. 4: Gen-spezifische Primer für RT-PCR. Aufgelistet sind Gen, Primer-Sequenz (5' - 3')/ Name und Hersteller des den Primer enthaltenden Kits, Produktgröße (Bp) und Genbank Accession ID.

Gen	Primersequenz (5' - 3')/ Name und Hersteller des den Primer enthaltenden Kits	Produkt Größe (BP)	GenBank Accession ID
OCT4	Human ES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit, Applied Stem Cell (USA)	144	NM_002701.4
SOX2	Human ES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit, Applied Stem Cell (USA)	151	NM_003106.2
NANOG	Human ES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit, Applied Stem Cell (USA)	255	NM_024865.2
TERT	Human ES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit, Applied Stem Cell (USA)	114	NM_198253.2
UTF1	Human ES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit, Applied Stem Cell (USA)	408	NM_003577.2
REX1	Human ES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit, Applied Stem Cell (USA)	306	NM_174900.3
DNMT3B	Human ES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit, Applied Stem Cell (USA)	242	NM_006892.3
COL1A1	Forward: gggattccctggacctaag Reverse: ggaacacctgcgtctcca	319	NM_000088.3
GAPDH	Human ES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit, Applied Stem Cell (USA)	452	AF261085.1
RPE65	Forward: gcaaaattgtgcatctgc Reverse: caccagatgccttggaaga	309	NM_000329.2
BEST1	Forward: cctgctgaacgagatgaaca Reverse: ggacacctgcaaattcctgt	328	NM_004183.3
RLBP1	Forward: acaagtatggccgagtgggtc Reverse: ccacattgtaggtcgtgggtg	306	NM_000326.4
TYR	Forward: ccatggataaagctgccaat Reverse: gccagatcttggatgaaa	347	NM_000372.4

Tab. 5: Gen-spezifische Primer für qRT-PCR. Aufgelistet sind Bezeichnung und Hersteller des hierfür verwendeten Panels.

Bezeichnung	Hersteller
TaqMan Hpsc Scorecard™ Panel (384 well, ViiA7)	Life Technologies

Tab. 6: Gen-spezifische Primer für Sequenzanalysen. Aufgelistet sind Exon, Bezeichnung (F = forward; R = reverse) und Primersequenz (5' - 3').

Exon	Bezeichnung	Primersequenz (5' - 3')
6	VMD2_ex6F	gaccataggtaccaggccc
	VMD2_ex6-R	ctaggtgagcccttcccac
7	VMD2_ex7 F	ctgatttcagggttcccacc
	VMD2-Ex07-R2	tttctaccgtgagaccttctt
8	VMD2-Ex8-F	tggaaatagcagcagctgagg
	VMD2-Ex8-R	acagtggggctcctctttgg

3.6. Kit-Systeme

Tab. 7: Kit-Systeme. Aufgelistet sind Bezeichnung und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme.

Kit	Hersteller
BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
cDNA RT Kit mit RNase Inhibitor	Life Technologies
Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Go Taq Green Master Mix Kit	Promega
Haus Taq Master Mix Kit	in house Herstellung, Institut für Humangenetik
hES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit	Applied Stem Cell
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Real Time PCR Kit	Taqman
Human STEMCCA Cre-Excisable Constitutive Polycistronic (OKS/L-Myc) Lentivirus Reprogramming Kit	Millipore

3.7. Molekularmassenstandard

Tab. 8: Molekularmassenstandard. Aufgelistet sind Bezeichnung und die Hersteller des in dieser Arbeit verwendeten Molekularmassenstandards.

Molekularmassenstandard	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas

3.8. Chemikalien

Tab. 9: Chemikalien. Aufgelistet sind Bezeichnung und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Activin A	Pepro Tech
Agarose (Biozym LE)	Biozym
B-27® Serum-Free Supplement (50 x)	Gibco by Life Technologies
bFGF	Pepro Tech
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Colcemid	Roche
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphit	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dulbecco's PBS	PAA
Essigsäure	PAA
Ethanol ≥ 99,8 p.a	Carl Roth
Ethanol 70 %	J.T. Baker
Ethidiumbromid 0,07 % Lösung	AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung pH 8,0 0,5 M	AppliChem
Fötales Rinderserum (FBS)	Gibco by Life Technologies
Fixierlösung	AGFA
Gelatine (0,1 %)	Millipore
Giemsa	Sigma Aldrich
Glutaraldehyd 25 %	Serva
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
Glucose	Merck
growth-factor reduced Matrigel (gfr Matrigel)	BD Biosciences
human embryonic stem cell qualified Matrigel (hESC qualified Matrigel)	BD Biosciences

Human iPS Reprogramming Boost Supplement II	Merck
HiDi Formamid	Life Technologies
Isopropaonol	Emsure
Kälberserum	Sigma
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
L-Glutamin	Gibco by Life Technologies
Magnesiumchlorid	Merck
MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100 x), Liquid	Gibco by Life Technologies
mTeSR™ 1 Medium	Stemcell Technologies
Natriumacetat Trihydrat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	VWR
Natriumdihydrogenphosphit	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate - SDS) ≥ 99 %	Carl Roth
Nicotinamid	Sigma-Aldrich
Nukleotid-Mix (dNTPs; Guanin G, Adenin A, Cytosin C, Thymidin T) 100 mM	Genaxxon
N-2 Supplement (100 x)	Gibco by Life Technologies
orego green 488 (OG 488)	Gibco by Life Technologies
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Penicillin/Streptomycin (100 x) (Pen/Strep)	Gibco by Life Technologies
Polybrene Infektion / Transfection Reagent 5 µg/ml	Merck
Proteaseinhibitor	Roche
Platin (BAL-TEC SCD 005)	BAL-TEC AG
Saccharose	Merck
Salzsäure konzentriert	Merck
SD431542	Merck
Sucrose	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Taurin	Merck
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Triton X-100	AppliChem
Tween 20	AppliChem
Trypsin (0,5 %) - EDTA (0,2 %) 10 x in PBS	Gibco by Life Technologies
Xylencyanol	Sigma

3.9. Medien, Puffer und Lösungen

Tab. 10: Medien, Puffer und Lösungen. Aufgelistet sind Bezeichnung, Zusammensetzung, Menge/ Konzentration und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.

Medium/Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Menge/ Konzentration	Hersteller
5x BigDye® Terminator v1.1 Sequenzung Buffer			Applied Biosystems
Antikörperlösung ICC	PBS	1 x	Life
	Ziegenserum	2,50 %	Abcam
	Triton X-100	0,10 %	AppliChem
Bikarbonatpuffer 0,1 M	Na ₂ CO ₃	0,2 M	Merck
	NaHCO ₃	0,2 M	Merck
Blocklösung ICC	PBS	1 x	Life
	Ziegenserum	10 %	Abcam
	Triton X-100	0,30 %	AppliChem
Blocklösung IF	PBS	1 x	Life
	Ziegenserum	10 %	Abcam
	Triton X-100	0,20 %	AppliChem
	BSA 100 x	0,10 %	Biolabs
	Tween 20	0,05 %	AppliChem
Bromphenolblaulösung	Bromphenolblau	0,05 g	Sigma-Aldrich
	Glycerin (87 %)	20 ml	Merck
	dH ₂ O	50 ml	Merck
Cell recovery solution			BD Biosciences
Cryo Stor™ CS 10 Medium			Stemcell Technologies
Dako Fluorescent Mounting Medium			DAKO
DMEM High Glucose Medium			Gibco by Life Technologies
DMEM/F12 Medium			Gibco by Life Technologies
DMEM/F-12 + GlutaMAX™ (1:1)			Gibco by Life Technologies
Einfriermedium (hiPSCs)	knock out™ serum replacement	90 %	Gibco by Life Technologies
	DMSO	10 %	AppliChem

Einfriermedium (POS)	Phosphatpuffer Na ₂ HPO ₃ /NaH ₂ PO ₃	10 mM	Merck
	NaCl	0,1 mM	VWR
	Sucrose	3 %	Merck
Entwicklerlösung			AGFA
Gentamicin solution			Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd-Fixierungslösung 2,5 %	Soerensen-Puffer 0,2 M	25 ml	Sigma-Aldrich
	Glutaraldehyd 25 %	5 ml	Sigma-Aldrich
	dH ₂ O	20 ml	Merck
knockout™ DMEM			Gibco by Life Technologies
knockout™ serum replacement			Gibco by Life Technologies
Lairspuffer (500 µl)	NaCl	1 M	VWR
	Tris, pH 8,3	1 M	USB
	EDTA, pH 8,0	0,5 ml	Merck
Neurobasal® Medium			Gibco by Life Technologies
Opti-MEM®			Gibco Invitrogen
Puffer IF	PBS	1 x	Gibco by Life Technologies
	Triton X-100	0,20 %	AppliChem
	BSA 100 x	0,10 %	Biolabs
	Tween 20	0,05 %	AppliChem
Puffer PB 5x (500mM) pH 7,2	Na ₂ HPO ₄	27,45 g	Merck
	NaH ₂ PO ₄	7,8 g	Merck
	dH ₂ O	500 ml	Merck
Puffer POS	Glucose	10 mM	Merck
	NaCl	130 mM	VWR
	MgCl ₂	2 mM	Promega
	Tris-HCl	20 mM	Sigma-Aldrich
	Taurin	5 mM	Fluka
PBS 10x pH 7,4	NaCl	80 g	VWR
	KCl	2 g	Merck
	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	14,4 g	Merck
	KH ₂ PO ₄	2,4 g	Merck
	dH ₂ O	ad. 1 l	Merck
PFA 4 % pH 7	PFA	1 g	Merck

	PB	1 x	Merck
	dH ₂ O	35 ml	Merck
Soerensen Puffer 0,2 M	KH ₂ PO ₄	4,08 g	Merck
	NaHPO ₄	24,12 g	Merck
	dH ₂ O	ad. 2 l	Merck
TBE 5x pH 8,0 Tris 216 g	Tris	216 g	USB
	Borsäure	110 g	Merck
	0,5 M EDTA	80 ml	Merck
	dH ₂ O	ad. 4 l	Merck
Thymidin-Lösung			Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)			Affymetrix
Xylencyanol Puffer	Xylencyanol	0,05 g	Sigma Aldrich
	Glycerin (87 %)	20 ml	AppliChem
	dH ₂ O	50 ml	Merck
Ziegenserum (10 %)			Abcam

3.10. Kulturmedien

Tab. 11: Kulturmedien. Aufgelistet sind Bezeichnung, Zusammensetzung, Menge/Konzentration und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien.

Medium	Zusammensetzung	Menge/ Konzentration	Hersteller
Fibroblasten Wachstumsmedium	DMEM high-glucose mit 4,5g/l L-Glutamin	1 x	Gibco by Life Technologies
	Fötales Rinderserum (FBS)	10 %	Sigma
	Penicillin	100 U/ml	Gibco by Life Technologies
	Streptomycin	0,1 mg/ml	Gibco by Life Technologies
hESC-Medium	DMEM/Ham's F12	ad. 200 ml	Gibco by Life Technologies
	knock out TM serum replacement	20 %	Gibco by Life Technologies
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X), Liquid	0,1 mM	Gibco by Life Technologies
	L-Glutamin	2 mM	Gibco by Life Technologies
	Gentamicin solution	50 mg/ml	Sigma Aldrich
	β-Mercaptoethanol	0,1 mM	Sigma
	SD431542	10 mM	Merck

	Human iPS Reprogramming Boost Supplement II	0,10 %	Merck
	bFGF	20 ng/ml	Pepro Tech
HEK293 Medium	DMEM high-glucose mit 4,5g/l L-Glutamin	ad. 500 ml	Gibco by Life Technologies
	FCS	10 %	Sigma
	Pen/Strep	1 %	Gibco by Life Technologies
	G-418		Sigma
MEF Expansion Medium	DMEM high-glucose mit 4,5 g/l L-Glutamin	1 x	Gibco by Life Technologies
	FBS	10 %	Sigma
	L-Glutamin	2 mM	Gibco by Life Technologies
	Penicillin 10 U/ml	100 U/ml	Gibco by Life Technologies
	Streptomycin 10 µg/ml	100 µg/ml	Gibco by Life Technologies
N2B27-Medium	DMEM/F-12 + GlutaMAX™ (1:1)	1 x	Gibco by Life Technologies
	Neurobasal® Medium	1 x	Gibco by Life Technologies
	N-2 Supplement (100 x)	0,5 x	Gibco by Life Technologies
	B-27® Serum-Free Supplement (50 x)	0,5 x	Gibco by Life Technologies
	β-Mercaptoethanol	0,1 mM	Sigma
	L-Glutamin	0,2 mM	Gibco by Life Technologies
	Penicillin 10 U/ml	100 U/ml	Gibco by Life Technologies
	Streptomycin 10 µg/ml	100 µg/ml	Gibco by Life Technologies
RPE Zysten Medium	DMEM(1x)+GlutaMAX™-I	ad. 500 ml	Gibco by Life Technologies
	knock out™ serum replacement	20 %	Gibco by Life Technologies
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X)	0,1 mM	Gibco by Life Technologies
	L-Glutamin	1 mM	Gibco by Life Technologies
	β-Mercaptoethanol	0,1 mM	Sigma
	Penicillin 10 U/ml	100 U/ml	Gibco by Life Technologies
	Streptomycin 10µg/ml	100 µg/ml	Gibco by Life Technologies

	Activin A	100 ng/ml	Pepro Tech
RPE Wachstumsmedium ohne Aktivin A	knockout TM DMEM	ad. 500 ml	Gibco by Life Technologies
	knock out TM serum replacement	20 %	Gibco by Life Technologies
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100 x)	0,1 mM	Gibco by Life Technologies
	L-Glutamin	2 mM	Gibco by Life Technologies
	β-Mercaptoethanol	0,1 mM	Sigma
	Penicillin 10 U/ml	100 U/ml	Gibco by Life Technologies
	Streptomycin 10 µg/ml	100 µg/ml	Gibco by Life Technologies
	Nicotinamid	10 mM	Sigma Aldrich
RPE Wachstumsmedium mit Aktivin A	knockout TM DMEM	ad. 500 ml	Gibco by Life Technologies
	knock out TM serum replacement	20 %	Gibco by Life Technologies
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X)	0,1 mM	Gibco by Life Technologies
	L-Glutamin	2 mM	Gibco by Life Technologies
	β-Mercaptoethanol	0,1 mM	Sigma
	Penicillin 10 U/ml	100 U/ml	Gibco by Life Technologies
	Streptomycin 10 µg/ml	100 µg/ml	Gibco by Life Technologies
	Nicotinamid	10 mM	Sigma Aldrich
	Activin A	62 ng/ml	Pepro Tech

3.11. Verbrauchsmaterial

Tab. 12: Verbrauchsmaterial. Aufgelistet sind Bezeichnung und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
24-Well Platten	Falcon
384-Well Platten	Applied Biosystems
6-Well Platten	Corning Costar
Cell lifter	Corning Costar
Cell strainer 40 µm	BD Biosciences
Chamber Slides, 4 Kammern	VWR
Coverslips	Roth
Deckgläschen 10 mm Ø	VWR
Einmal Filtrationssystem 250 ml, 22 µm	Cornin Costar
Einmal Plastikpipetten	Sarstedt
Einwegpasteurpipetten 3 ml	VWR
Eppendorf-Cups 0,5 ml	Sarstedt
Eppendorf-Cups 1,5 ml	Sarstedt
Eppendorf-Cups 2 ml	Sarstedt
Falcontube 15 ml	Sarstedt
Falcontube 50 ml	Sarstedt
Flaschen 250 ml Zellkultur	VWR
Glaspipetten	Brand
Glasplättchen	VWR
Handschuhe Nitril blau	VWR
Handschuhe Nitril grün	KIMTECH
Kryotubes 1,6 ml	Sarstedt
Leit Tabs	Science Services
Objektträger Polylysin	Thermo Scientific
Pasteurpipetten	VWR
Parafilm	BEMIS
PCR-Cups	Biozym
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen 10 µl	VWR
Pipettenspitzen 100 µl	VWR
Pipettenspitzen 1000 µl	VWR
Pipettenspitzen gestopft	Biozym
Röhrchen 11 ml	BD Biosciences

Skalpell	Feather
Transwell Filter 0,4 µm	Corning Costar
Zellkulturschalen	Sarstedt
Zellschaber	Orange Scientific

3.12. Geräte

Tab. 13: Geräte. Aufgelistet sind Bezeichnung und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyser	Lap Chip
Autoklav V-150	Systec
Binokular	Nikon
Brutschrank 37 °C	Memmert
CO2 Inkubator CB 210	BINDER
Dark Hood DH30/32	Biostep
Eismaschine AF 100	Scotsman
Elektrophoresekammer Blue Marine 200	Serva
Färbekammer	Mechanische Werkstatt Universität Regensburg
Feinwaage Explorer	OHAUS
Fluoreszenzmikroskop Axioskop2 mot plus	Zeiss
Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN 3	BIO-RAD
Handheld Automated Cell Counter	Millipore
Kämme	BIO-RAD
Konfokales Mikroskop LSM510	Zeiss
Kritisch-Punkt-Apparat "BALZERS CPD 030"	BAL-TEC AG, Leica
Kryo Einfriergerät	Nalgene
Kryostat Leica LM1850	Leica
Lichtmikroskop Primo Vert	Zeiss
Magnetrührer VMS-A S40	VWR
Mikrowelle KOR-6D07	Daewoo
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Millipore
NanoDrop ND1000 Spektrophotometer	NanoDrop
Netzgerät Blue Power 500	Serva
Netzgerät Blue Power Plus	Serva
Object Marker	Nikon
pH Meter VMS-A	VWR
Pipette Reference 10µl	Eppe

Pipette Reference 100 µl	Eppendorf
Pipette Reference 1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe accu-jet	Brand
Rasterelektronenmikroskop (REM; "FEI Quanta 400FEG")	FEI Deutschland GmbH
Rotationsgerät	VWR
Schüttelinkubator Ceromat R	B. Braun Biotech
Sterilbank	BDK
Steromikroskop S6D	Leica
Thermocycler T3	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Vakuumpumpe MZ 2 C	Vacuubrand GmbH
ViiA™ 7 System Taqman	Invitrogen
Volt/Ohmmeter (EVOMX)	World Precision Instruments
Vortex Genie2	Scientific Industries
Waage	SCALTEC
Wasserbad	GFL
Wasserdestilliergerät	GFL
Werkbank Heraguard	Heraeus
Zentrifuge Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R (Falcontubezentrifuge)	Heraeus
Zentrifuge Sigma 2-5, groß	Sigma

3.13. Software

Tab. 14: Software. Aufgelistet sind Bezeichnung, Verwendung und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Software.

Software	Verwendung	Hersteller
AxioVision LE 4.8	Lichtelektronen Mikroskopie	Zeiss
CorelDraw X4	Verschieden	Corel Cooperation
Lsm	Konfokale Mikroskopie	Zeiss
Microsoft Office	Verschieden	Microsoft
ViiA™ 7 System	qRT-PCR	Invitrogen

4. Methoden

4.1. Zellisolierung und Kultivierung

4.1.1. Gewinnung adulter humaner dermaler Fibroblasten

Ein entsprechendes Ethikvotum [Aktennummer 11-101-0228; Titel: BEST_iPSC-Study: Towards a patient-specific cellular model for Bestrophinopathies by applying the induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) technology (Etablierung eines patientenspezifischen Zelllinienmodells für Bestrophinopathien durch Einsatz induzierter pluripotenter Stammzellen)] lag zu Beginn dieser Dissertation vor. Hautstanzen von Patienten und Kontrollpersonen wurden durch einen Dermatologen nach standardisierten Protokollen in Kooperation mit dem Institut für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg als 4 x 4 mm große Biopsien vom Oberschenkel, Abdomen oder der Innenseite des Oberarms entnommen. Die Gewebestücke wurden anschließend mechanisch mit Hilfe eines Skalpells (disposable scalpel No.11, Feather) und einer Kolibripinzette unter dem Stereomikroskop S6D (Leica) in etwa 0,5 mm große Stücke zerkleinert. Nach kurzem Antrocknen auf 100 mm Zellkulturschalen (tissue culture dish 100 x 20 mm, Sarstedt) wurden die Gewebestücke vorsichtig mit Fibroblasten-Wachstumsmedium bedeckt, das sich aus Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high-glucose mit 4,5 g/l L-Glutamin, supplementiert mit 10 % Fötalem Rinderserum (FBS), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (alles Gibco by Life Technologies) (**Tab. 11**) zusammensetzte. Das Medium wurde an Tag 1, sowie im Folgenden alle 3 Tage gewechselt. Die Gewebestücke adhärten auf der Zellkulturschalenoberfläche und nach einem Zeitraum von etwa 10 bis 15 Tagen konnte ein Herauswachsen einzelner Fibroblastenförmiger Zellen beobachtet werden. Sobald die Zellen ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht hatten, wurden sie einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 0.05 % Trypsin-EDTA (Gibco by Life Technologies) für etwa 5 Minuten im Brutschrank (Mettler) inkubiert, sodass sich die Zellen von ihrer Oberfläche lösten. Mit Fibroblasten-Wachstumsmedium wurde die Ablösungsreaktion gestoppt und die Zellsuspension anschließend bei 560 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in Fibroblasten-Wachstumsmedium resuspendiert, die Zellen in unbeschichtete Gewebekulturflaschen (VWR) ausgesät und mit zweiwöchentlichem Medienwechsel subkultiviert. Als Umgebungsbedingung für die Zellkulturen wurde angefeuchtete Luft mit 5 % CO₂ bei 37 °C gewählt.

4.1.2. Reprogrammierung der Fibroblasten zu hiPSCs



Abb. 4: Zeitstrahl des Reprogrammierungsprotokolls von Tag 0 – 25. iMEFs = mouse embryonic feeder cells.
Quelle: Stephanie Zimmermann.

Mit Hilfe eines Lentivirus (Human STEMCCA Cre-Excisable Constitutive Polycistronic [OKS/L-Myc] Lentivirus Reprogramming Kit; Millipore) wurden die Fibroblasten gemäß Herstellerangaben durch Überexprimierung der vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und L-Myc zu hiPSCs reprogrammiert. Das vorgegebene Protokoll war bereits zu Beginn dieser Dissertation etabliert und erstreckte sich hierbei von Tag 0 bis Tag 25 (**Abb. 4**).

An Tag 0 wurden Fibroblasten der Passage 4 oder 5 in einer Dichte von etwa 1×10^4 bis 1×10^5 Zellen pro Well auf einer 6-Well Platte ausgesät und in Fibroblasten Wachstumsmedium kultiviert. Zusätzlich wurde je ein Well zur Kontrolle angelegt, um am Folgetag die genaue Zellzahl und die Menge benötigten Virus ermitteln zu können. Die Zahl der ausgesäten Zellen war dann optimal, wenn die Fibroblasten an Tag 5 eine 90 % ige Konfluenz erreicht hatten.

An Tag 1 wurden die Zellen, die auf den Kontroll-Wells gewachsen waren, mit einem Handheld Automated Cell Counter (Millipore) gezählt, um die Menge des benötigten Virus nach der vom Hersteller angegebenen Formel berechnen zu können. Dann folgte die Transduktion. Die Fibroblasten erhielten neues Wachstumsmedium, sowie Polybrene Infection/Transfection Reagent (Merck) mit einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$, um dem Virus eine bessere Haftung auf der Zelloberfläche zu ermöglichen. Im Anschluss wurde die berechnete Menge Viren mit einer MOI (Multiplicity of infection) von 50 auf die Zellen gegeben und bei 800 g zentrifugiert, um die Viren näher an die Fibroblasten zu bringen. Nach 1 h Zentrifugation wurde das Medium erneut gewechselt und frisches Polybrene Infection/Transfection Reagent mit derselben Menge Viren auf die Fibroblasten gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

An Tag 2 wurden die Zellen dreimal mit $1 \times \text{PBS}$ gewaschen und in frischem Wachstumsmedium kultiviert.

An Tag 3 und 4 wurde das Medium unter Beobachtung der Zellmorphologie gewechselt.

An Tag 4 wurden zudem mouse embryonic feeder cells (iMEFs; Millipore) in einer vom Hersteller angegebenen Dichte auf 10 cm Schalen ausgesät, die zuvor mit 0,1 % iger Gelatine (Millipore) gecoatet worden waren. Diese wurden über Nacht im Brutschrank in MEF Expansion Medium kultiviert, das sich aus DMEM High-Glucose mit 4,5 g/l L-Glutamin, 10 % Fötalem Rinderserum (FBS), 2 mM L-Glutamine, sowie 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (alles Gibco by Life Technologies) (**Tab. 11**) zusammensetzte.

An Tag 5 wurden die infizierten Fibroblasten, wie im Protokoll beschrieben, mit Trypsin-EDTA (Gibco by Life Technologies) abgelöst, gezählt und in der vom Hersteller angegebenen Dichte auf 10 cm Schalen ausgesät, auf denen die iMEFs über Nacht ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht hatten. Die infizierten Fibroblasten wurden in Fibroblasten-Wachstumsmedium auf die iMEFs gebracht, sodass sie über Nacht anwachsen konnten. Am Folgetag wurde das Medium auf human embryonic stem cell (hESC) Medium, bestehend aus DMEM/Ham's F 12, 2 mM L-Glutamin, 20 % knock out serum replacement, 0,1 mM non-essential amino acids (alles Gibco by Life Technologies), 0,1 mM β -mercaptoethanol (Sigma), 20 ng/ml bFGF (Pepro Tech), 50 mg/ml Gentamicin (Sigma-Aldrich) und 0,1 % Human iPS Reprogramming Boost Supplement II (Merck) (**Tab. 11**) umgestellt.

Zwischen Tag 7 und Tag 11 fand ein täglicher Medienwechsel statt, wobei die Zellmorphologie weiterhin genau überwacht wurde, da sich laut Protokoll kleine hiPSC-Kolonien bereits ab Tag 9 bilden konnten. In unseren Experimenten zeigten sich erste hiPSC-Klone frühestens zwischen Tag 15 und 25. Um ältere und abgestorbene iMEFs zu ersetzen, wurden jeden siebten Tag $1,5 \times 10^5$ neue iMEFs auf die 6-Well Platten gegeben, welche die heranwachsenden hiPSCs enthielten.

Zwischen Tag 15 und 35 wurde das Wachstum der hiPSCs täglich kontrolliert, um hiPSC-Kolonien, die die entsprechende Größe und homogene Stammzellmorphologie aufwiesen, rechtzeitig mechanisch mit einer 100 μ l Pipette (Sarstedt) auf eine mit hESC-qualified Matrigel (BD Biosciences) beschichtete 6-Well Platte umsiedeln zu können, bevor eine spontane Differenzierung der Zellen einsetzte.

Das den Herstellerangaben entsprechend aliquotierte und bei -80 °C gelagerte hESC-qualified Matrigel wurde hierfür langsam im Kühlschrank aufgetaut, den Herstellerangaben entsprechend mit DMEM/Ham's F 12 (Gibco by Life Technologies) verdünnt (meist etwa im Verhältnis 1:80) und auf die Zellkulturplatten verteilt (6-Well: 1 ml; 12-Well: 0,5 ml). Damit man die mit Matrigel bedeckten, aber noch nicht gecoateten Platten im Kühlschrank für

maximal sieben Tage aufbewahren konnte, wurde nochmals je dieselbe Menge DMEM/Ham's F 12 auf die Wells gegeben und die Platten sorgfältig mit Parafilm (bemis) umwickelt, um einer Verdunstung entgegenzuwirken. Sobald man die Platten benötigte, wurden sie für mindestens eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37 °C gecoatet, einmal mit 1 x PBS gewaschen und dann mit 1 ml mTeSRTM1 Medium (Stemcell Technologies) bedeckt.

4.1.3. Kultivierung der hiPSCs

Die anschließende Kultivierung und Passagierung der hiPSCs erfolgte ohne Serum und iMEFS in mTeSRTM1 Medium (Stemcell Technologies) auf mit hESC-qualified Matrigel (BD Biosciences) beschichteten 6-Well Platten (Corning Costar). Der Medienwechsel erfolgte täglich. Alle 4 – 7 Tage mussten die hiPSCs außerdem im Verhältnis 1:3 gesplittet werden, um die Zellen vor Absterben oder Differenzieren zu bewahren. Hierfür mussten die Regionen mit vereinzelt auftretenden Fibroblasten und unregelmäßigen Zellkolonien unter dem Lichtmikroskop (Primo Vert, Zeiss) mithilfe eines object markers (Nikon) zunächst sorgfältig markiert werden, um differenzierte Zellkolonien aus der Kultur entfernen zu können. Dann wurden die hiPSCs erst mit DMEM/Ham's F 12 gewaschen und im Anschluss für 3 – 5 Minuten (min) mit Dispase (Stemcell Technologies), 1 mg/ml, inkubiert, bis sich die Ränder der hiPSC-Klone zu lösen begannen. Schließlich wurden die angedauten Zellen dreimal sorgfältig mit DMEM/Ham's F 12 gewaschen, um die Dispase vollständig zu entfernen und die markierten Zellregionen mit einer Pasteurpipette absaugen zu können. Die restlichen Zellen wurden mit mTeSRTM1 Medium bedeckt und die übrig gebliebenen hiPSC-Kolonien mechanisch mittels Glaspipette zerkleinert. Sie wurden mit einem Cell Lifter (Corning Costar) abgeschabt, mit einer 10 ml Pipette auf die Matrigelplatten im Verhältnis 1:3 aufgeteilt und in mTeSRTM1 Medium subkultiviert. Der Medienwechsel entfiel am darauf folgenden Tag und wurde danach wie gewohnt täglich fortgesetzt.

Kryokonservierung

Zur Aufbewahrung wurden die hiPSCs wie oben beschrieben aufgereinigt und gewaschen. Dann wurden sie mit einer 10 ml Pipette grob zerkleinert, in Einfriermedium (hiPSC) (**Tab. 10**), bestehend aus 90 % knockout serum replacement (Gibco by Life Technologies) und 10 % DMSO (AppliChem) resuspendiert und in Kryotubes (Sarstedt) gegeben. Über Nacht wurden sie in mit Isopropanol (Emsure) gefüllten Kryo Einfriergeräten (Nalgene) bei -80 °C tiefgefroren und am Folgetag in den Stickstoffturm bei -190 °C überführt.

4.1.4. *In vitro*-Differenzierung der hiPSCs zu hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen

Ein wesentliches Ziel dieser Dissertation war das Testen und Etablieren verschiedener Differenzierungsprotokolle zur Generierung von induzierten RPE-Zellen. Folgende Protokolle wurden bearbeitet:

Protokoll nach Zhu, Carido et al. (2013)

Für das Protokoll nach Zhu, Carido et al. (2013) [69] wurden die hiPSCs zunächst in mTeSRTM1 Medium auf mit hESC-qualified Matrigel beschichteten 6-Well Platten für 3 bis 5 Tage kultiviert. Bei Erreichen eines konfluenten Wachstumsstadiums wurden die Kolonien unter dem Mikroskop gründlich auf differenzierte Stellen untersucht, diese markiert und wie bereits beschrieben (*siehe 3.1.3*) mit Dispase und Pasteurpipette entfernt. Jedes gereinigte und angedaute 6-Well wurde mit 1 ml N2B27 Medium (**Tab. 11**) bedeckt, bestehend aus DMEM/F12 + GlutaMAXTM, 1 x Neurobasal Medium, 0,5 x B27 Supplement, 0,5 x N2 Supplement, 0,2 mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin (alles Gibco by Life Technologies) und 0,1 mM β -Mercaptoethanol (Sigma). Dann wurden die Zellen von zwei konfluenten Wells einer 6-Well Platte mithilfe eines Cell Lifters in ein 15 ml Falcon überführt. Dieses wurde bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (700 g) und der Überstand abgenommen. Das Falcon wurde kurz auf Eis gestellt und das Pellet im Anschluss vorsichtig in hESC-qualified Matrigel mit einer 1000 μ l Pipette resuspendiert, wobei man etwa 300 μ l Matrigel für 2 Falcons benötigte. Ein 50 – 100 μ l großer Tropfen der in Matrigel suspendierten Zellklumpen wurde je auf ein 1,5 cm Glasplättchen (VWR) gegeben, das sich in einer 3,5 cm Zellkulturschale (Sarstedt) befand und für 6 – 8 min bei RT angetrocknet, sodass das Matrigel gelierte. Die Zellen wurden im Brutschrank in N2B27 kultiviert, ein Medienwechsel erfolgte ausschließlich an Tag 3.

An Tag 5 wurden die aus den Zellklumpen entstandenen Zysten auf Transwell® Filter (0,4 μ m; Corning Costar) übergeführt. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden etwa fünf Matrigeltropfen mit den darin enthaltenen Zysten in 5 ml eiskalter cell recovery solution (BD Biosciences) für 30 – 45 min in einem 15 ml Falcon unter mehrmaligem Invertieren gelöst. Sobald keine Matrigelstückchen mehr sichtbar waren, wurde das Falcon für 10 bis 15 min gerade in Eis gesteckt, sodass die Zysten zu Boden sanken. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen, pelletiert (300g, 1 min, RT) und das Pellet vorsichtig mit einer 1000 μ l Pipette in 1 ml TrypLETM Select (1 x) (Gibco by Life Technologies) resuspendiert. Beim Verdau (3 min, 37 °C) wurde das Falcon ständig bewegt,

um ein Anliegen der Zysten an der Wand zu verhindern. Mit einer 1000 µl Pipette wurden die Zellen dann für maximal eine Minute resuspendiert, pelletiert (1000 g, 2 min, RT) und in 4 ml N2B27 Medium aufgenommen. Über einen mit 1 ml N2B27 Medium angefeuchteten Cell Strainer, 40 µm (BD Biosciences), wurden die Zellen aufgeeinzelt und als Suspension in ein 15 µl Falcon überführt. Die Zellkonzentrationen wurden mit einem Cell Counter ermittelt, die Zellen entsprechend der gewünschten Zellzahl (200.000 – 400.000 Zellen pro Transwell einer 24-Well Platte) in N2B27 Medium resuspendiert, auf den für 60 min mit growth factor-reduced (gfr-) Matrigel (Verdünnung 1:40) gecoateten Transwell® Filtern ausgesät und im Brutschrank subkultiviert. Nach zwei Tagen wurde das N2B27 Medium durch RPE Zysten Medium (**Tab. 11**), bestehend aus DMEM/F12 + GlutaMAXTM, 20 % knock out serum replacement, 0,1 mM Non-Essential Amino Acids, 1 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (alles Gibco by Life Technologies), 0,1 mM β-mercaptoethanol (Sigma) und 100 ng/ml Activin A (Pepro Tech) ersetzt und dieses im Folgenden alle 2 - 3 Tage gewechselt. Sowohl das N2B27, als auch das RPE Zysten Medium wurden mit einem Einmalfiltrationssystem (Flasche, 250 ml 22 µM, orange; Corning Costar) filtriert.

Protokoll nach Krohne, Westenskow et al. (2012)

Von kleinen Änderungen abgesehen basiert dieses Protokoll auf einer Veröffentlichung von Krohne, Westenskow et al. (2012) [66]. HiPSCs wurden für 12 bis 14 Tage zunächst in mTeSRTM1 Medium auf mit hESC-qualified Matrigel beschichteten 6-Well Platten kultiviert. Sobald die Zellen ein konfluentes Wachstumsstadium erreichten hatten, wurde durch Umstellen des Mediums eine Differenzierung der hiPSCs in hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen induziert. Hierfür erhielten die hiPSCs 3 Wochen lang RPE-Wachstumsmedium (**Tab. 11**), das sich aus knockout DMEM, 2 mM L-Glutamin, 20 % knock out serum replacement, 0,1 mM Non-Essential Amino Acids (alles Gibco by Life Technologies), 0,1 mM β-Mercaptoethanol (Sigma), 100 U/l Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (Gibco by Life Technologies) und 10 mM Nicotinamid (Sigma Aldrich) zusammensetzte. Das Medium wurde mit einem Einmalfiltrationssystem filtriert. Ein Medienwechsel erfolgte täglich. Hier ist darauf hinzuweisen, dass mindestens 4 ml Medium in jedes Well der 6-Well Platten gegeben werden mussten, da die konfluenten Zellen einen extremen Stoffwechselumsatz zeigten.

Für die gerichtete Differenzierung wurden dem Medium ab Woche 4 solange 62 ng/ml Activin A (Pepro Tech) zugefügt, bis sich im Zeitraum von etwa 2 Wochen pigmentierte Zellverbände innerhalb der Zellkultur zeigten.

Nach einem Zeitraum von insgesamt acht bis zehn Wochen konnten pigmentierte Zellcluster mechanisch mit Hilfe eines Skalpells von ihrer Oberfläche gelöst, enzymatisch mit TrypLE™ Select (1 x) aufgezinkt und auf mit growth factor-reduced (gfr-) Matrigel (Verdünnung 1:30; BD Biosciences) gecoateten 6-Well Platten ausgesät werden.

4.1.5. Kultivierung der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen

Die Subkultivierung der nach Krohne, Westenskow et al. (2012) [66] erzeugten hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen erfolgte in RPE Wachstumsmedium ohne Activin A (**Tab. 11**), wobei es etwa 4 Wochen dauerte, bis die Zellen ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht und ihre charakteristische Morphologie zurückerlangt hatten. Dann erst konnten die hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen zur Vergrößerung des Zellmaterials passagiert werden. Das hiPSC-abgeleitete RPE wurde behutsam mit 1 mM EDTA in PBS angelöst und nach einem Verdau mit Tryp-LE für 10 min im Verhältnis von 1:6 bis 1:10 auf mit gfr-Matrigel beschichteten Platten in RPE Wachstumsmedium ohne Activin A aufgeteilt. Die Passagierung erfolgte alle 4 - 5 Wochen, der Medienwechsel jeden zweiten Tag.

Für die nachfolgenden Experimente wurden Zellen sowohl auf mit gfr-Matrigel (1:30) gecoateten 6- und 12-Well Transwell® Filter als auch auf 6- und 12-Well Platten ohne Filtereinsätze ausgesät und kultiviert.

Kryokonservierung

Um Zellbanken erstellen zu können, wurden hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen bei -190 °C in CryoStor™CS10 Medium (Stemcell Technologies) eingefroren.

4.1.6. Zeitlicher Überblick der vollständigen Generierung einer hiPSC abgeleiteten RPE-Zelllinie

Hier unter Verwendung des Differenzierungsprotokolls nach Krohne, Westeskow et al. (2012) [66]. An Tag 0 erfolgte die Entnahme der Hautstanzen. Diese wurden mechanisch zerkleinert und auf 10 cm Schalen ausgesät. Nach 2 bis 5 Wochen hatten sich hieraus Fibroblasten gebildet (Passage p < 6), die nach lentiviraler Transduktion zwischen Woche 6 und 10 zu hiPSC-Klonen reprogrammiert wurden. Sie konnten etwa ab Woche 11 mechanisch exzidiert und monoklonal passagiert (p < 10) werden, sodass etwa ab Woche 15 eine Differenzierung nach Krohne, Westenskow et al. (2012) [66] zu hiPSC-abgeleiteten RPE Zellen durch Umstellung des hESC-Mediums in RPE-Wachstumsmedium eingeleitet werden konnte. Die

gerichtete Differenzierung erfolgte meist in Woche 19 durch die Zugabe von Aktivin A, sodass sich erst nach ca. 20 Wochen erstes hiPSC-abgeleitetes RPE gebildet hatte. Dabei dauerte es nach jeder Passage etwa 4 Wochen, ehe die Zellen wieder ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht hatten. Erst wenn die hiPSC-abgeleiteten RPE Zellen etwa 2 Monate lang auf Transwellfiltern kultiviert worden waren, wiesen sie einen entsprechenden Reifegrad auf, um für strukturelle und funktionelle Experimente herangezogen zu werden. Insgesamt variierten die Wachstumsgeschwindigkeiten innerhalb der unterschiedlichen Zelllinien, sodass kleine Schwankungen bei den vorgegebenen Zeitpunkten möglich waren (Abb. 5).

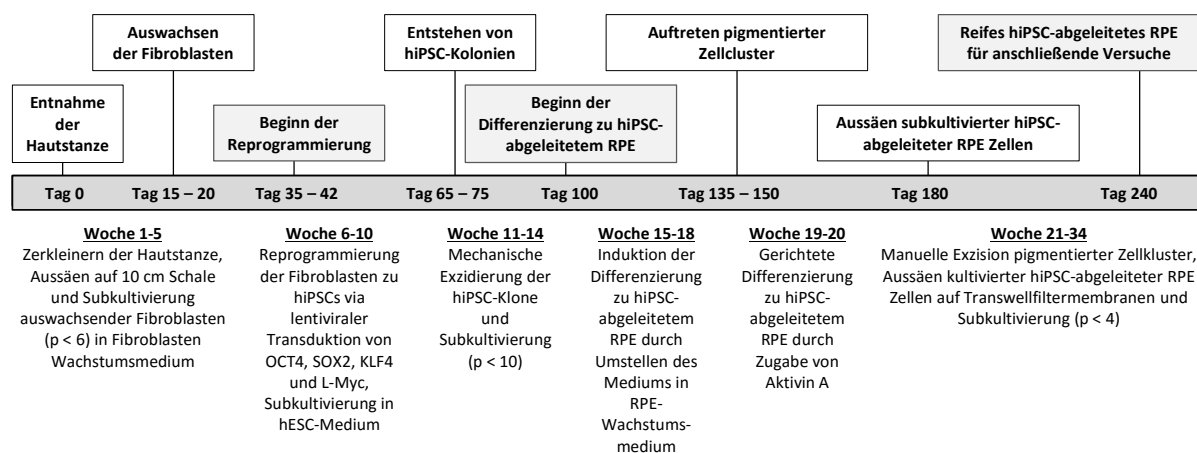


Abb. 5: Graphik zur zeitlichen Einordnung der Reprogrammierungs- und Differenzierungsprotokolle. Von der Reprogrammierung der Fibroblasten zu hiPSCs über deren Differenzierung zu hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen nach Krohne, Westenskow et al. (2012) [66] dauerte es insgesamt etwa 8 Monate (p = Passage). Erst dann waren anschließende Versuche an reifen hiPSC-abgeleiteten RPE Zellen möglich. Quelle: Stephanie Zimmermann, modifiziert nach einer Abbildung von Fr. Dr. Caroline Brandl.

4.2. Karyotypisierung

Für die numerischen und strukturellen chromosomalen Analysen der Fibroblasten und der hiPSCs wurden Karyotypisierungen durchgeführt. Dies erfolgte dankenswerterweise durch Fr. Dr. Johanna Käsbaier, Zentrum für Humangenetik, Regensburg. Hierfür wurden Fibroblasten mit Fibroblastenwachstumsmedium in unbeschichteten und hiPSCs mit mTeSRTM1 Medium in mit hESC-qualified Matrigel beschichteten 25 cm² Zellkulturflaschen (VWR) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Thymidin-Lösung (Sigma Aldrich) synchronisiert und nachfolgend für 120 min mit Colcemid (Roche) bei 37 °C behandelt. Nach Ablösung von der Zellkulturschalenoberfläche durch Trypsin-EDTA (Gibco by Life Technologies) wurden die Zellen aufgenommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in hypotoner

Lösung (75 mM KCl; PAA) resuspendiert und für 12 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte schließlich die Fixierung mit Methanol und Essigsäure (beides PAA). Die Metaphasen-Spreads wurden auf Coverslips (Roth) aufgebracht, über Nacht getrocknet und nach Trypsin-Vorbehandlung mit Giemsa (Sigma Aldrich) gefärbt.

4.3. RNA-basierte molekularbiologische Methoden

4.3.1. RNA-Isolation

Um Gen-Expressionanalysen zur Charakterisierung der verschiedenen Zellarten und Zelllinien durchzuführen, wurde Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen isoliert. Dies erfolgte mittels RNeasy® Mini Kit (Quiagen) gemäß Herstellerangaben, wobei die Qualität und Quantität der gewonnen Proben mittels Photospektrometer (NanoDrop) bestimmt wurde. RNA aus retinalem Gewebe wurde von Andrea Milekovic, Institut für Humangenetik, Regensburg, bezogen.

4.3.2. cDNA Synthese mittels Reverser Transkription

Die cDNA Synthese erfolgte unter Verwendung der RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Quiagen). Das mehrstufige Pippetierschema ist in **Tab. 15** dargestellt.

Tab. 15: Reaktionsschema der cDNA Synthese.

Schritt	Komponente	Volumen/ Reaktion	Temperatur	Zeit
1	RNA	1 µg	65 °C	5 min
	Random Hexamer Primer (100 µg)	1 µl		
	Nuclease freies H ₂ O	ad 13,5 µl		
2	5 x Reaktionspuffer	1 µl	25 °C	5 min
	dNTP Mix (10mM)	2 µl		
	Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,5 µl		
3			42 °C	60 min
4			70 °C	5 min

4.3.3. Kontroll-PCR

Die Überprüfung der cDNA Synthese erfolgte über eine PCR mit dem ubiquitär expremierten Gen β -Glucoronidase (Gus). Das Pipettierschema hierfür ist in **Tab. 16**, das entsprechende Thermocyclerprogramm in **Tab. 17** dargestellt.

Tab. 16: Pipettierschema der GUS-PCR.

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration	Stammlösung
H ₂ O	17,5 µl		
Taq Puffer inkl. 15mM MgCl ₂	2,5 µl	1 x	10 x
dNTPs	0,5 µl	0,2 mM	10 mM
Primer (F+R)	1,0 µl	0,4 µM	10 µM
Haus-Taq	0,5 µl	0,1 U/µl	5 U/µl
Template DNA	1 µl		

Abkürzungen: F = Forward; R = Reverse.

Tab. 17: Temperaturprofil der GUS-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94 °C	3 min	1
2	94 °C	30 s	35
	57 °C	30 s	
	72 °C	30 s	
3	72 °C	5 min	1
4	10 °C	pause	1

4.4. cDNA-und DNA-basierte molekularbiologische Methoden

4.4.1. Primerdesign

Gen-spezifische Primer wurden mit dem Primer3 Programm (<http://simgene.com/Primer3>) nach den voreingestellten Standardbedingungen für die entsprechende Zielregion designed und sind in **Tab. 4** aufgelistet. HiPSC-RNA wurde außerdem mittels hES/iPS Cell Pluripotency RT-PCR Kit (Applied Stem Cell) charakterisiert (**Tab. 4**).

4.4.2. Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur spezifischen Amplifikation bestimmter Genabschnitte wurde cDNA (RT-PCR) verwendet. Das Pipettierschema für die verwendete Go Taq Polymerase (Promega) mit einem

Endvolumen von 25 µl ist in **Tab. 18**, das entsprechende Thermocyclerprogramm in **Tab. 19** dargestellt. Gegebenenfalls wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu 5 % Endkonzentration hinzugesetzt.

Tab. 18: Pipettierschema einer PCR/RT-PCR mit der Go Taq-Polymerase (Promega) unter Standardbedingungen.

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration	Stammlösung
H ₂ O		16,9 µl	
Taq Puffer inkl. 15 mM MgCl ₂	5 µl	1 x	5 x
dNTPs	1 µl	0,4 mM	10 mM
Primer (F+R)	1 µl	0,4 µM	10 µM
Go Taq-Polymerase	0,1 µl	0,02 U/µl	5 U/µl
Template DNA		1 µl	

Template DNA wurde in einer Konzentration von ca. 50 ng eingesetzt, ggf. wurde die H₂O-Menge entsprechend angepasst. Abkürzungen: F = Forward; R = Reverse.

Tab. 19: Temperatur für eine RT-PCR unter Standardbedingungen.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94 °C	3 min	1
2	94 °C	30 s	35
	57 °C	30 s	
	72 °C	0,5 - 2 min	
3	72 °C	5 min	1
4	10 °C	pause	1

Die hierfür verwendeten Primerkombinationen sind in **Tab. 4** des Materialteils aufgelistet.

4.4.3. Analytische Agarosegelelektrophorese

Zur Beurteilung der PCR-Produkte erfolgte eine analytische Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 2 % verwendet. Die Herstellung erfolgte aus Agarose (Biozym) und 1 x TBE (**Tab. 10**) sowie einigen Tropfen Ethidiumbromid (Amplichem), die der abgekühlten Lösung zugefügt wurden. Die Proben (25 µl Ansatz) wurden mit 5 µl Ladepuffer versetzt, der aus gleichen Volumina Bromphenolblau- und Xylenxanol-Puffer (**Tab. 10**) hergestellt wurde. Davon wurden ca. 8 µl auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der Gene RulerTM DNA Ladder Mix (Fermentas). Diese wurden zuvor mit 100 µl Bromphenolblau, 100 µl Xylenxanol sowie 200 µl Millipore-H₂O

versetzt. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 180 - 200 V für ca. 30 min, die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht (Dark Hood DH30/32, Biostep).

4.4.4. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erfolgte, dankenswerterweise unterstützt von Andrea Milenkovic, Institut für Humangenetik, Regensburg, mittels hochleistungsfähigem cDNA RT Kit mit RNase Inhibitor (Life Technologies). Dabei wurde die Expression von Pluripotenzmarkern sowie spezieller Keimblattmarker (Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) mit Hilfe des TaqMan Hpsc ScorecardTM Panel (384 well, ViiA7, Life Technologies) beurteilt. Die Durchführung erfolgte nach einem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll, die Ergebnisse wurden mittels cloud-basierter online Analyse Software ausgewertet.

4.4.5. Sequenzierung

Um die entsprechenden *BEST1*-Mutationen in der DNA der Fibroblasten und der hiPSCs nachweisen zu können, wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Die Sequenzierung der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte dabei durch die Kettenabbruch-Methode nach Sanger [70]. Für die PCR wurde das BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet, mit anschließender Vervielfältigung wie im Folgenden dargestellt.

Gewinnen von DNA

Die Zellen wurden nach Trypsinierung zu einem Pellet verarbeitet und dieses unter Zugabe von 500 µl Laispuffer, bestehend aus 1 M NaCl, 5 ml 1 M Tris (pH 8,3) und 0,5 ml EDTA (pH 8,0) (**Tab. 10**) sowie 50 µl 20 % SDS und 50 µl Protease (10 mg/ml) in ein 1,5 ml Eppendorf Cup überführt und entweder für 5 Stunden bei 50 °C, oder über Nacht bei 37 °C, auf dem Stuart® rotator SB2 verdaut. Am Folgetag wurden die Cups zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, 13.000 g, RT, 15 min) und der Überstand in ein 2 ml Cup überführt. Unter Zugabe von 500 µl Isopropanol (2-Propanol, Merck Millipore) und mehrmaligem Invertieren der Cups, konnte ein Ausfallen der DNA beobachtet werden. Nach erneutem Zentrifugieren (Biofuge pico, Heraeus, 13.000 g, RT, 15 min) wurde die DNA mit 500 µl 70 % EtOH (Ethanol absolut; J.T. Baker) gewaschen. Wieder wurden die Cups zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, 13.000 g, RT, 10 min) und der Überstand komplett abpipettiert, sodass das Pellet kurz antrocknen konnte. Dann wurde es in 400 µl Millipore H₂O aufgenommen und über Nacht auf einem Rotationsgerät (VWR) gelöst. Die DNA-Proben wurden mittels

NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) gemessen und die Arbeitsverdünnung auf eine Konzentration von 20 – 30 ng/μl eingestellt.

Für eine Sequenzierung nach Sanger [70] wurden die zu sequenzierenden Zielbereiche bestimmt und eine PCR mit den jeweiligen Primern (**Tab. 6**) unter den entsprechenden Bedingungen durchgeführt, an die sich Verdau, Cycle Sequencing und Fällung anschlossen (s.u.).

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde ein sequenzspezifisches, komplementäres Oligonukleotidpaar (forward- und reverse-Primer; **Tab. 6**), thermostabile Taq-Polymerase und ein Nukleotid-Mix (**Tab. 20**) eingesetzt. Verschiedene Temperaturen (**Tab. 21**) waren notwendig (Thermocycler TProfessional BASIC 96), um die DNA zunächst zu denaturieren (Bildung von Einzelsträngen bei 94 °C), dann die Anlagerung der Primer zu ermöglichen (Annealing bei 50 – 65 °C) und schließlich die Elongation der Primer entlang der DNA-Matrize zu einem neuen Tochterstrang zu gewährleisten (Temperaturoptimum der DNA-Polymerase bei 72 °C). Dieser PCR-Zyklus (Denaturierung, Annealing, Elongation) wurde 30- bis 40-mal wiederholt.

Tab. 20: MM für eine GXX-DMSO PCR (Genaxxon).

Reagenz	μl	Endkonzentration	Konzentration Stammlösung	Hersteller
Millipore-A.D.	15,2			Millipore
DMSO	1,3	5 %	100 %	Sigma
GXX MgCl ₂	2	2 mM	25 mM	Genaxxon
GXX 10 x Rx Buffer	2,5	1 x	10 x	Genaxxon
dNTP's	0,5	0,2 mM	10 mM	Genaxxon
Primer F+R	2	0,4 μM	5 μM	vgl. Tab. 6
GXX Taq-Pol.	0,1	0,02 U/μl	5 U/μl	Genaxxon
Gesamt	23,6			

Für den Reaktionsansatz waren zudem mindestens **50 ng DNA (ca. 2 μl)** zum Mastermix zuzugeben.

Tab. 21: Temperaturprofil der GXX-DMSO PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95 °C	3 min	
2	95 °C	30 s	33
	58 °C	30 s	
	72 °C	30 s	
5	72 °C	10 min	

Die Auswertung und Beurteilung der PCR erfolgte auf einem 1 %-igen Agarosegel, wobei die Leer-Kontrolle, die Kontroll-DNA und die Größe und Qualität der Banden begutachtet und dokumentiert wurden.

Verdau

Beim Verdau war der Ansatz (**Tab. 22**) auf Eis durchzuführen.

Tab. 22: Reaktionsansatz für einen Exo I / AAP Verdau.

Komponenten	µl	Hersteller
Exonuklease I (Exo I)	0,1	USB
Antarktische Alkalische Phosphatase (AAP)	0,25	New England Biolabs (NEB)
Rotisolv HPLC Gradient Grade H ₂ O	3,65	Roth
Gesamt	4	

Je nach Stärke des PCR-Produkts waren ca. 0,5 - 3,0 µl PCR-Produkt zum Mastermix zuzugeben. Die Proben wurden unmittelbar anschließend gemischt, zentrifugiert und im Thermocycler das Programm „Verdau“ (**Tab. 23**) gestartet.

Tab. 23: Temperaturprofil „Verdau“.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	37 °C	15 min
2	80 °C	15 min

Cycle Sequencing

Auch hier war der Ansatz auf Eis durchzuführen.

Tab. 24: MM für einen Cycle Sequencing Durchgang.

Komponenten	µl	Hersteller
5 x Sequencing Buffer	1,85	Life Technologies
Big Dye Terminator	0,3	Life Technologies
Rotisolv HPLC Gradient Grade H ₂ O	1,85	Roth
Gesamt	4	

Außerdem war 1 µl des jeweiligen spezifischen Sequenzier-Primers (forward oder reverse) sowie 4 µl Sequenzieransatz (Verdau) zuzugeben.

Zum Mastermix (Tab. 24) war außerdem 1 µl des jeweiligen spezifischen Sequenzier-Primers (forward oder reverse) sowie 4 µl Sequenzieransatz zuzugeben. Die Proben wurden unmittelbar anschließend gemischt, zentrifugiert und im Thermocycler das Programm „Cycle Sequencing“ (Tab. 25) gestartet.

Tab. 25: Temperaturprofil „Cycle Sequencing“.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	96 °C	3 min	
2	96 °C	30 s	27
	55 °C	30 s	
	60 °C	3 min	
5	60 °C	5 min	

Natriumacetat / Ethanol-Fällung

Zum Cycle Sequencing Ansatz wurden 2 µl Natriumacetat-Trihydrat (Merck) hinzugeben und 2 bis 3 min inkubiert. Dann wurde 50 µl EtOH (100 %) (Ethanol absolut; J.T. Baker) hinzugefügt und das Ganze gemischt. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 3.100 g (4.100 rpm bei Rotor mit 17 cm Radius) bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Reaktionsgefäße kurz bei 170 g (800 rpm bei Rotor mit 17 cm Radius) über Kopf mit einem zusammengelegten Blatt Zellstoff trocken zentrifugiert. Es wurden 70 µl EtOH (70 %)

(Ethanol absolut; J.T. Baker) pro Ansatz hinzugegeben und der Ansatz durch Vortexen gemischt. Dann wurden die Proben 30 min bei 3.100 g (4.100 rpm bei Rotor mit 17 cm Radius) bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Reaktionsgefäße erneut kurz bei 170 g (800 rpm bei Rotor mit 17 cm Radius) über Kopf mit einem zusammengelegten Blatt Zellstoff trockenzentrifugiert. Für die Sequenzierung wurde das Präzipitat in 15 µl Hi-Di™ Formamide (Life Technologies) aufgenommen, in eine Sequenzierplatte überführt und bis zur Sequenzierung im Kühlschrank bei 2 – 8 °C gelagert.

4.5. Immunfluoreszenzfärbungen

4.5.1. hiPSCs

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz-Analysen wurden hiPSCs auf mit hESC-qualified Matrigel beschichteten Chamber Slides™ ausgesät und für 2 bis 3 Tage in mTeSR™1 Medium kultiviert.

An Tag 1 der Färbung wurden die Chamber Slides™ (Glas, 4 Kammern, VWR) zunächst zweimal mit 1 x PBS, pH 7,4 gewaschen und die Zellen anschließend mit 4 % Paraformaldehyd ([PFA] in PBS, Roth) für 10 min fixiert. Nach erneutem Waschen mit 1 x PBS (3 x, je 5 Min) erfolgte die Inkubation mit Blocklösung ICC, bestehend aus 10 % Ziegenerum und 0,3 % Triton X-100 in PBS (**Tab. 10**) für 30 min bei Raumtemperatur, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Die primären Antikörper wurden in mit 0,1 % Triton X-100 und 2,5 % Ziegenerum versetztem PBS (Antikörperlösung ICC, **Tab. 10**) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit 1 x PBS und die Zugabe der sekundären Antikörper bei RT zusammen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Dilactat (Sigma Aldrich) zum Färben der Zellkerne. Alle verwendeten primären und sekundären Antikörper sind inklusive Verdünnung und Herstellerangaben in **Tab. 3** aufgelistet. Um Negativkontrollen zu erhalten, wurde jeweils dasselbe Procedere angewandt und lediglich die primären Antikörper durch 1 x PBS ersetzt. Außerdem wurden human embryonic kidney 293 (HEK) Zellen mit denselben Antikörpern gefärbt, um eine Spezifität der Antikörper für Stammzellen gewährleisten zu können. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen, die Begrenzung der chamber slides sorgfältig entfernt und die Zellen in DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium (DAKO) eingebettet, um sie später mit einem Fluoreszenzmikroskop analysieren zu können.

4.5.2. hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen

Da hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen auf Transwell® Filtern oder Chamber Slides™ kultiviert wurden, die mit gfr-Matrigel beschichtet waren, musste man beim Färben äußerst vorsichtig vorgehen, um eine Ablösung der Zellen von ihrer Unterlage zu vermeiden. Die Färbung verlief über drei Tage, alle verwendeten primären und sekundären Antikörper sind inklusive Verdünnung und Herstellerangaben in **Tab. 3** aufgelistet.

An Tag 1 wurden die Transwell® Filtern zunächst zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und dann mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min von beiden Seiten der Filtermembran aus fixiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 100 mM Glycin in PBS. Nach einem Waschschrift mit 1 x PBS wurden die Zellen für 90 min bei RT mit einer Immunfluoreszenz Block Lösung (IF) (**Tab. 10**) geblockt, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Diese enthielt 10 % Ziegen Serum, 0,2 % Triton X-100, 0,1 % gereinigtes BSA und 0,05 % Tween 20 (AppliChem) in PBS. Zuletzt folgte die Inkubation der primären Antikörper über Nacht bei 4 °C.

An Tag 2 wurden die Zellen dreimal mit IF Puffer Lösung (0,2 % Triton X-100, 0,1 % gereinigtes BSA, 0,05 % Tween 20 in PBS, **Tab. 10**: Puffer IF) für je 20 min bei RT gewaschen und mit den sekundären Antikörpern über Nacht bei 4 °C gegengefärbt.

An Tag 3 wurden die Zellen dann einmal für 20 min mit IF Puffer Lösung (0,2 % Triton X-100, 0,1 % gereinigtes BSA, 0,05 % Tween 20 in PBS) und zweimal für je 10 min mit 1 x PBS gewaschen, beides bei RT. Danach wurden die Zellkerne für 20 min mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Dilactat gefärbt. Abschließend wurden die Zellen ein letztes Mal mit 1 x PBS für 10 min bei RT gewaschen, die Filtermembranen mit einem Skalpell exzidiert, auf Objektträger gebracht und in DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium eingebettet.

Um die RPE Spezifität der Antikörper zu gewahren, dienten hiPSCs als Negativkontrollen, bei denen dasselbe Procedere angewandt und lediglich der primäre Antikörper durch 1 x PBS ersetzt wurde. Die fixierten Zellen wurden unter dem konfokalen Mikroskop LSM510 (Zeiss) betrachtet und die Bilder durch ein spezielles Analysemodul in Intensitätsstufen unterhalb der Sättigungsgrenze aufgenommen.

4.6. Bestimmung des Transepithelialen Widerstandes (TER)

Um im Rahmen funktioneller Analysen ein polares Wachstum der hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen nachweisen zu können, wurden diese auf mit gfr-Matrigel beschichteten Transwell-filtern kultiviert. Gemäß den Herstellerangaben wurde mit dem Volt/Ohmmeter ([EVOMX] World Precision Instruments) in regelmäßigen Zeitabständen die von den hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen erzeugten, transepithelialen Widerstände (TER) gemessen. Hierfür wurde die Sonde vor der Messung kurz mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert, in 150 mM NaCl gewaschen und so positioniert, dass die längere Elektrode mit dem Boden der unteren Kammer in Berührung stand, während die kürzere Elektrode in der oberen Kammer etwas oberhalb des Zellrasens zum Liegen kam. Die gemessenen Widerstände (TER) wurden mit der Filterfläche multipliziert und in Ωcm^2 angegeben. Für die Berechnung des tatsächlichen Widerstandes wurde jeweils der Widerstand eines unbewachsenen, mit gfr-Matrigel beschichteten Transwellfilters entsprechender Größe als Leerwert vom gemessenen Widerstand abgezogen.

4.7. Fütterungsexperimente mit Photorezeptoraußensegmenten (POS)

Die Gewinnung und Fluoreszenzmarkierung der POS erfolgte dankenswerterweise in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Felix Grassmann, Institut für Humangenetik, Regensburg.

4.7.1. Gewinnung von POS

Porcine Retinae wurden mit 20 % Sucrose (Merck) und 1 x Proteaseinhibitor (1 Tablette Roche Complete Mini auf 1 ml PBS) homogenisiert, pelletiert (500 g, 5 min, 4 °C) und erneut mit 20 % Sucrose und 1 x Proteaseinhibitor homogenisiert. Im Anschluss folgte die Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation (**Tab. 26**) auf dem Rotor SW 40 (100.000 g, 120 min, 4 °C, ohne Abbremsen). Dann wurde die Fraktion, welche die POS enthielt, vorsichtig von oben mit einer Pipette abgenommen, in ein 11 ml Röhrchen (BD, Biosciences) überführt, mit 0,02 M Tris-Puffer gewaschen und mit dem Rotor TLA 100.3 pelletiert (10.000 g, 10 min, RT, ohne Abbremsen). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml Einfriermedium (POS) aus 10 mM Phosphatpuffer, 0,1 mM NaCl und 2,5 % Sucrose (**Tab. 10**) aufgenommen.

Abschließend wurde die POS-Konzentration mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt, die POS aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren.

Tab. 26: Pufferzusammensetzung Dichtegradientenzentrifugation für 9 Gradienten, final 50 ml.

Komponente	Konzentration	Volumen/Gewicht
Glucose	10 mM	8,91 g
NaCl	130 mM	58,5 ml
MgCl ₂	2 mM	9 ml
Tris-HCl	20 mM	9 ml
Taurin	5 mM	11,25 ml

Der pH musste mit 1 M NaOH bzw. HCl auf 7,4 eingestellt werden, die Lösung auf 140 ml aufgefüllt und je 16 ml in die einzelnen Gradientenlösungen gegeben werden.

4.7.2. Fluoreszenzmarkierung der POS

Vor den Fütterungsexperimenten wurden die POS mit Oregon green 488 (OG 488) (Gibco by Life Technologies) gelabelt.

Hierfür wurden 5 mg OG 488 in 500 µl DMSO (1:100 in H₂O verdünnt) gelöst, aliquotiert und konnten so bei -20 °C für maximal 3 Monate aufbewahrt werden.

Je 500 µl der bei -80 °C gelagerten POS wurden zunächst langsam aufgetaut (25 °C, Wasserbad), pelletiert (10.000 g, 3 min, 4 °C) und in 100 µl 0,1 M Bicarbonatpuffer, aus 0,2 M Na₂CO₃ und 0,2 M NaHCO₃, pH 8,3, (**Tab. 10**) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl OG 488 zu DMSO (1:100 in H₂O verdünnt) wurden die POS gevortext und für 90 min lichtgeschützt bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden sie 2 x mit 1000 µl 1 x PBS gewaschen, für 2 min bei 10.000 g pelletiert und für 20 min mit serumhaltigem Medium lichtgeschützt auf einem Schüttler bei 4 °C geblockt.

Die fluoreszenzmarkierten POS wurden erneut pelletiert (10.000 g, 3 min, 4 °C), in frisches Opti-MEM® (Gibco Invitrogen) (**Tab. 10**) aufgenommen, aliquotiert und konnten bis zum Gebrauch bei -80 °C tiefgefroren werden.

4.7.3. Fütterung der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen mit POS

Um die Phagozytose und den Abbau der POS in Experimenten mit Zeitreihen beleuchten zu können, wurden hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen für 2 Monate auf Transwellfiltern kultiviert und für 90 min, 6 h und 24 h mit fluoreszenzmarkierten POS in einer Konzentration von 20 POS pro Zelle inkubiert.

Um nicht phagozytierte POS von der Zelloberfläche zu entfernen, wurde das hiPSC-abgeleitete RPE gründlich mit 1 x PBS gewaschen, bevor es mit polyklonalen rabbit anti-human ZO-1 Antikörpern gefärbt wurde (*siehe* 3.5). Die Zellen wurden auf den ausgeschnittenen Transwellfiltermembranen in DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium eingebettet und unter dem konfokalen Mikroskop (LSM510) betrachtet.

Zusammen mit Dr. Vladimir Milenkovic, Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie, Universität Regensburg, wurden konfokale Bilder in Intensitätsstufen unterhalb der Sättigung aufgenommen, bestimmt mit dem Intensitäts-Analyse-Modul und nachfolgend ausgewertet. Dies geschah mit Hilfe eines ImageJ software package (version 1.47) gemäß der von Abramoff et al. (2004) beschriebenen Methode [71]. Zur Analyse der POS-Phagozytose der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen wurden die konfokalen Bilderserien (z-stacks), die im grünen Kanal aufgenommen wurden, in das ImageJ geladen und an das „Z-Project Sum Slices“ Kommando übertragen. Dann wurden die Schwellenwerte durch Analyse des Histogramms des gesamten Bildes bestimmt und für alle nachfolgenden Bilder derselbe Schwellenwert verwendet. Die Gesamtzahl der POS wurde mit Hilfe des Kommandos „Analyze Particles“ bestimmt.

4.8. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für detaillierte strukturelle Analysen wurden die Zellen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Vorbereitung und Durchführung der REM-Präparation, sowie die Aufnahme der Bilder erfolgte dankenswerterweise in Kooperation mit Fr. PD Dr. Federlin, Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universitätsklinikum Regensburg, wobei die Zellen sowohl im low-vacuum (low-vac), als auch im high-vacuum (high-vac) modus betrachtet wurden.

Für beide Methoden mussten die hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen zunächst auf den mit gfr-Matrigel beschichteten Transwellfiltern fixiert werden, auf denen sie zuvor 2 Monate lang kultiviert worden waren. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden sie für 30 min mit 2,5 % Glutaraldehyd (Serva) in 0,1 M Soerensen-Puffer, pH 7,4 (**Tab. 10**) und Aqua bidest. bei RT fixiert. Dann wurden die Zellen 3 x mit 0,1 M Soerensen-Puffer, pH 7,4, (Merck) gewaschen und konnten darin bis zum Mikroskopieren für einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Für die Niedrigvakuum Betrachtung (low vac) unter dem REM wurden die Zellen vor dem Aufbringen auf Stubs mittels Leit-Tabs (Science Services) noch 3 x bei RT mit Aqua bidest. gewaschen, um Salze zu entfernen und dann mittels REM „FEI Quanta 400 FEG“ (FEI Deutschland GmbH) im low vac modus (LFD + EDX-PLA; 4,0 kV, Spot 4, WD \approx 10 mm, 1,5 Torr, tilt 30°) in noch feuchtem Zustand studiert.

Für die Hochvakuum Betrachtung (high vac) mussten die Zellen zunächst ebenso 3 x mit Aqua bidest. gewaschen werden, bevor sie einer Entwässerungsreihe (aus Ethanol abs. 8006 von J.T.Baker oder Merck Nr. 986) mit steigenden Alkoholkonzentrationen (30 – 96 %) zugeführt werden konnten (**Tab. 27**).

Tab. 27: Entwässerungsreihe mit steigenden Alkoholkonzentrationen zur Zellpräparation für Aufnahmen mit dem REM im high vac modus.

Ethanolkonzentration	Zeit
30 % Ethanol	2 x 10 min
50 % Ethanol	2 x 10 min
70 % Ethanol	2 x 10 min (eventuell 1 x über Nacht im Kühlschrank)
80 % Ethanol	2 x 10 min
90 % Ethanol	2 x 10 min
96 % Ethanol	2 x 10 min
Ethanol abs.	2 x 10 min

Nach der Trocknung mit dem Kritisch-Punkt-Apparat „BALZERS CPD 030“ (BAL-TEC AG, Leica) mit dem Zwischenmedium Ethanol abs. und dem Trockenmedium CO₂, bei der das Medium insgesamt 6 x gewechselt wurde, wurden die Plättchen mittels Leit-Tabs auf Stubs montiert und 2 x 30 s bei 30 mA in 50 mm Abstand mit Platin (BAL-TEC SCD 005, BAL-TEC AG, Leica) besputtert. Anschließend wurden sie im Exsikkator aufbewahrt und unter dem REM „FEI Quanta 400 FEG“ im high vac modus (4,0 kV, Spot 3, WD \approx 6 mm, $\leq 10^{-4}$ Torr, tilt 30°) in getrocknetem Zustand untersucht.

5. Ergebnisse

5.1. Auswahl geeigneter Zellspender

Für die nachfolgenden Experimente wurden zwei gesunde Probanden ohne Veränderungen im *BEST1* Gen (wt_1 und wt_2) sowie drei Patienten mit unterschiedlichen Mutationen im *BEST1* Gen (+/Q238R, +/A243V, +/I295del) gewählt (Tab. 28).

Tab. 28: Probanden- und Patienten-Zelllinien. Aufgelistet sind Bezeichnung, Geschlecht/Alter und Mutation.

Bezeichnung	Geschlecht/ Alter	Mutation
wt_1	weiblich/ 26	Wt
wt_2	männlich/ 31	Wt
+/Q238R	männlich/ 71	AVMD, <i>BEST1</i> , Exon 6, c.713A>G (p.Gln238Arg), heterozygot
+/A243V	männlich/ 37	BVMD, <i>BEST1</i> , Exon 7, c.728C>T (p.Ala243Val), heterozygot
+/I295del	männlich/ 19	BVMD, <i>BEST1</i> , Exon 8, c.884_886delTCA (p.Ile295del), heterozygot

Wt = Wildtyp (keine Mutation im *BEST1* Gen); *AVMD* = Adulte Vitelliforme Makuladystrophie;

BVMD = Best'sche vitelliforme Makuladystrophie;

Sowohl in Farbfundusfotos als auch in der Optischen Kohärenztomographie (OCT) konnte man bei allen Patienten, von denen die hier beschriebenen, mutanten Zelllinien abgeleitet wurden, als phänotypisches Korrelat atrophische Veränderungen im Bereich der Netzhaut erkennen (Abb. 6).

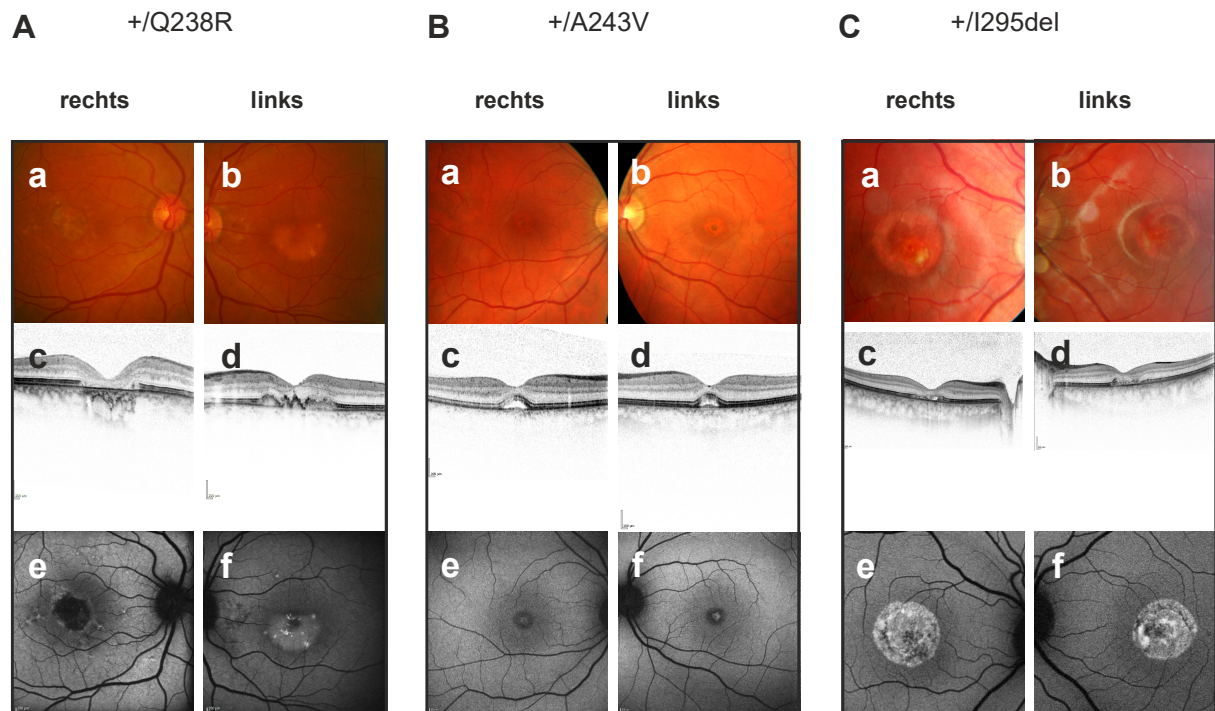


Abb. 6: Farbfundusfotos der zentralen Netzhaut, Optische Kohärenztomographie (OCT) und Autofluoreszenz der 3 Patienten mit unterschiedlichen Mutationen im BEST1 Gen. **A:** 71 Jahre, m, AVMD mit heterozygoter, dominant negativer Mutation im BEST1 Gen (+/Q238R). **a-b:** Zentraler Fundus des rechten (a) bzw. linken (b) Auges im fortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung mit atrophischen Veränderungen im Bereich der Makula. **c-d:** OCT der rechten (c) bzw. linken (d) Fovea mit Atrophie der äußeren Netzhautschichten und des RPE, rechts führend. **e-f:** Autofluoreszenz des rechten (e) und linken (f) Auges mit optisch dichtem, hyperfluoreszierendem sub-RPE Material, va. links. **B:** 37 Jahre, m, BVMD mit heterozygoter, dominant negativer Mutation im BEST1 Gen (+/A243V). **a-b:** Zentraler Fundus des rechten (a) bzw. linken (b) Auges mit eher atypisch hyperpigmentierten Pigmentepithelverklumpungen. **c-d:** OCT des rechten (c) bzw. linken (d) Auges mit Abhebung des RPE. Diese sind nicht rein serös, sondern beinhalten auch solides Material. **e-f:** Autofluoreszenz rechts (e) und links (f) mit subfovealer Hyperfluoreszenz, korrespondierend zum Material im OCT sowie einem hypofluoreszenten umgebenden Ring. **C:** 19 Jahre, m, BVMD mit heterozygoter, dominant negativer Mutation im BEST1 Gen (+/I295del). **a-b:** Zentraler Fundus des rechten (a) und linken (b) Auges im vitelliruptiven Stadium der Erkrankung. **c-d:** OCT rechts (c) und links (d) mit Irregularitäten von RPE und Photorezeptoren sowie etwas subretinaler Flüssigkeit rechts. **e-f:** Hyperfluoreszenzen des rechten (e) und linken (f) Auges, korrespondierend zu den Läsionen auf dem Fundusbild und OCT. Sämtliche Abbildungen wurden dankenswerterweise von Fr. Dr. Caroline Brandl, Institut für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Regensburg, befundet. Abkürzung: m = männlich. Quelle: Die Abbildungen in A wurden von Fr. PD Dr. Charlotte M. Reiff, Klinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Freiburg, die Abbildungen in B und C vom Institut für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Regensburg, zur Verfügung gestellt.

5.2. Isolierung und Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten

Hautstanzen der drei beschriebenen Patienten (+/Q238, +/A243V, +/I295del) wurden ergänzend zu den bereits erzeugten Fibroblastenlinien gesunder Kontrollpersonen (wt_1 und wt_2) in Zellkulturschalen mechanisch zerkleinert und in Fibroblasten-Wachstumsmedium kultiviert (**Abb. 7 A/B**). Nach einem Zeitraum von etwa zwei bis drei Wochen konnte ein Herauswachsen einzelner Fibroblasten beobachtet werden (**Abb. 7 C**), die langgestreckte Zellkörper und spindelförmige Zellkerne sowie filigrane zytoplasmatische Fortsätze aufwiesen (**Abb. 7 D**). Dieses Auswachsen konnte bei allen Hautstanzen erreicht werden, auch wenn die verschiedenen Fibroblasten-Linien in ihrer Proliferationszeit zum Teil gewisse Unterschiede zeigten. Sobald die Zellen ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht hatten, wurden sie subkultiviert, kryokonserviert und standen nach 4 – 5 Passagen für die Reprogrammierung zur Verfügung.

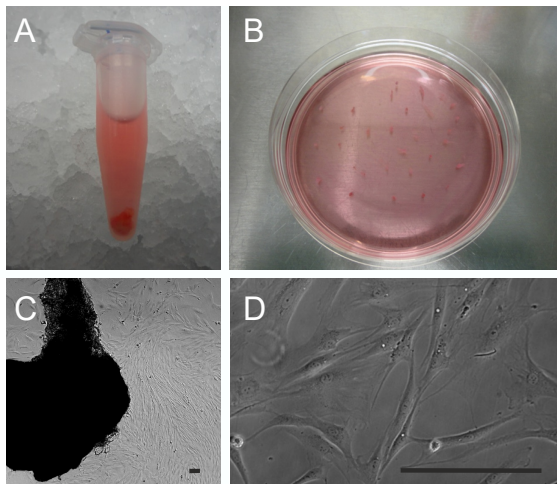


Abb. 7: Hautstanzen und auswachsende Fibroblasten. **A:** Hautstanze einer gesunden, 26-jährigen Spenderin („wt_1“) wenige Minuten nach deren Entnahme. Quelle: Stephanie Zimmermann. **B:** Makroskopische Aufnahme der daraus gewonnenen Gewebstückchen nach mechanischer Zerkleinerung und Adhäsion auf einer 10 cm Zellkulturschale in Wachstumsmedium. Quelle: Stephanie Zimmermann. **C:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme aus einem dieser Gewebstückchen auswachsender humaner dermaler Fibroblasten („hFib_wt_1_p0“). Maßstabsbalken: 100 μ m. Modifiziert nach Brandl,

Zimmermann et al. (2014) [5]. **D:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme humaner dermaler Fibroblasten bei Passage 1 („hFib_wt_1_p1“). Maßstabsbalken: 100 μ m. Quelle: Stephanie Zimmermann.

5.3. Reprogrammierung der Fibroblasten zu hiPSCs

Mit Hilfe des polycistronischen Lentivirus wurden die Fibroblasten durch Überexprimierung der vier Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *L-Myc* zu induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) reprogrammiert (**Abb. 8**).

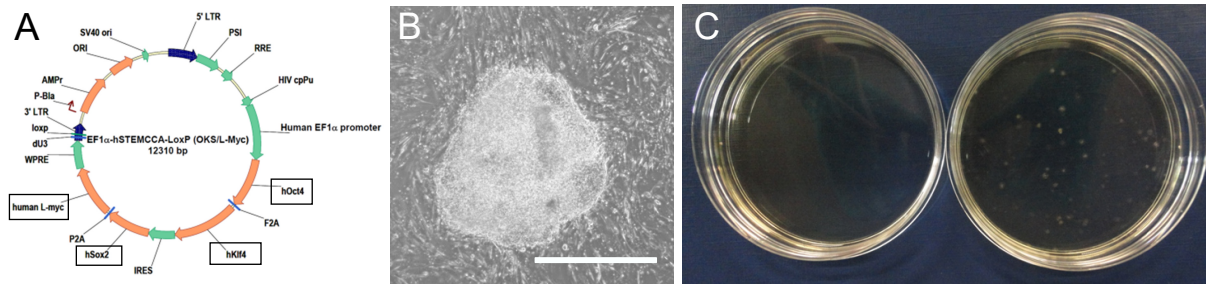


Abb. 8: Transduktion. **A:** Schema des polycistronischen Lentivirus mit Markierung (Rechtecke) der maßgeblichen Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und L-Myc. Modifiziert nach "Human STEMCCA Cre-Excisable Constitutive Polycistronic (OKS/L-Myc) Lentivirus Reprogramming Kit", Catalog No. SCR548, Millipore. **B:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme einer heranwachsenden Kolonie induzierter pluripotenter Stammzellen („hiPSC_wt_1_p0“) mit einem dichten Zellverband sowie stammzelltypischer, runder Morphologie inmitten umliegender Fibroblasten. Maßstabsbalken: 500 μ m. Quelle: Stephanie Zimmermann. **C:** Makroskopische Aufnahme auswachsender Stammzellverbände (wt_1) an Tag 1 (links) und Tag 20 (rechts) nach Transduktion in einer 10 cm Zellkulturschale. Quelle: Fr. Dr. Caroline Brandl.

5.4. Kultivierung der hiPSCs

Im Gegensatz zu den Fibroblasten, die einen konfluenten Zellrasen bildeten, wuchsen die hiPSCs in scharf begrenzten, flachen, dicht mit Stammzellen bepackten Kolonien. Ihre Zellkörper waren rund und zeichneten sich durch prominente Kernkörperchen (Nucleoli) sowie einen schmalen Zytoplasmasaum mit hoher Kern-Zytoplasma-Relation aus (Abb. 9). Diese Morphologie war derer humaner embryonaler Stammzellen sehr ähnlich.

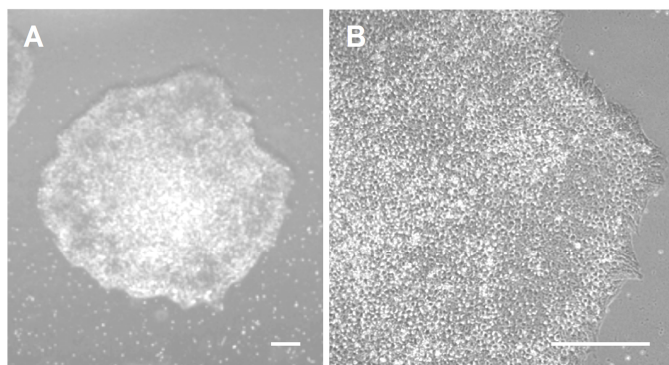


Abb. 9: Durchlichtmikroskopie von hiPSC_wt_1_c1 bei Passage 9. **A:** Typische Morphologie eines runden, scharf begrenzten, dicht bepackten Stammzellverbandes, der dem humaner embryonaler Stammzellen ähnelt. **B:** In der Vergrößerung zeigen sich homogene Zellen mit großem, rundem Zellkern und schmalen Zytoplasmasaum. Maßstabsbalken: 100 μ m. Quelle: Stephanie Zimmermann.

Alle 4 bis 7 Tage mussten die hiPSCs im Verhältnis 1:3 gesplittet werden. So konnte einer Re-Differenzierung oder einem Absterben der Zellen entgegengewirkt werden. Jeder einzelne Klon auf jedem Well der 6-Well Platten musste hierfür sorgfältig unter dem Lichtmikroskop

inspiziert werden, sodass unregelmäßige Zellareale mit dem Object Marker markiert und vor der Passagierung mit einer Pasteurpipette entfernt werden konnten (**Abb. 10**).

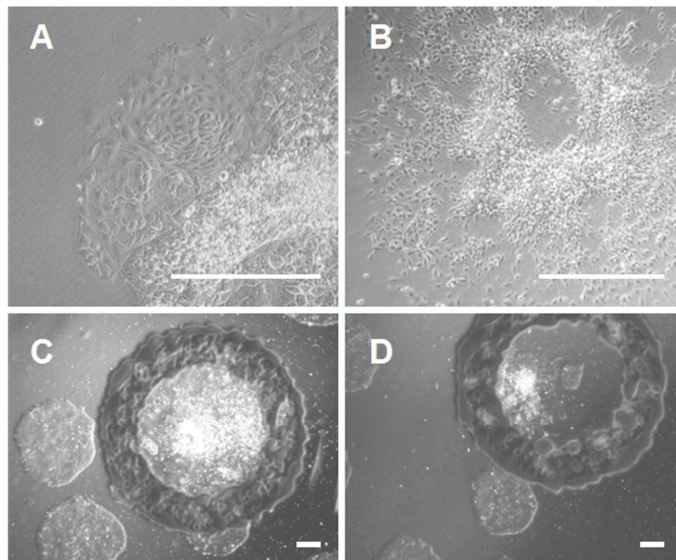


Abb. 10: Aufrechterhaltung einer reinen hiPS-Zellkultur. **A-D:** Alle 4 - 7d mussten die hiPSCs im Verhältnis 1:3 gesplittet werden, um die Zellen vor Absterben oder Differenzieren zu bewahren. Hierfür wurden die Regionen mit vereinzelt auftretenden, länglichen Zellen und unregelmäßigen Zellarealen sorgfältig unter dem Lichtmikroskop inspiziert, mit dem Object Marker markiert (**C-D**) und vor dem Splitten mit einer Pasteurpipette entfernt. Maßstabsbalken: 100 μ m. Quelle: Stephanie Zimmermann.

Um Zellbanken erstellen zu können, wurden die hiPSCs zudem kryokonserviert. Hierfür wurden die Stammzellkolonien zunächst monoklonal expandiert, sodass für jede Zelllinie mehrere Klone weggefroren werden konnten.

5.5. Charakterisierung der hiPSCs

5.5.1. Mutationsnachweis

Durch Sequenzanalysen konnte ein Fortbestehen der patientenspezifischen Mutationen in den hiPSCs nachgewiesen werden (**Abb. 11**).

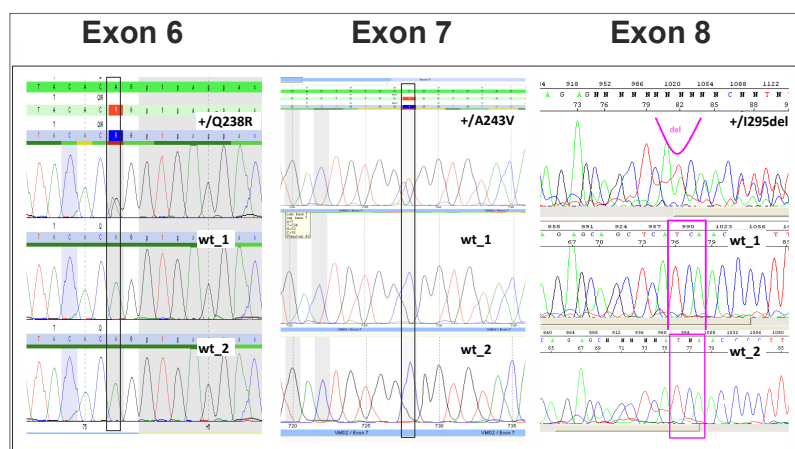


Abb. 11: Sequenzanalyse. Bestätigung des Fortbestehens der entsprechenden Mutationen in den jeweiligen Exonen des BEST1 Gens bei den verschiedenen Zelllinien. **Exon 6**, BEST1: hiPSC_+/Q238R: Punktmutation, c.713A>G (p.Gln238Arg), heterozygot. **Exon 7**, BEST1: hiPSC_+/A243V: Punktmutation, c.728C>T (p.Ala243Val), heterozygot. **Exon 8**, BEST1: hiPSC_+/I295del: Deletion, c.884_886delTCA (p.Ile295del), heterozygot. Abgebildet sind die jeweiligen Sequenzen der mutanten Zelllinie sowie wt_1 und wt_2

als Vergleichssequenz. Quelle: Stephanie Zimmermann, visualisiert und befundet zusammen mit Christoph Meier, Institut für Humangenetik, Regensburg.

5.5.2. Karyotypisierung

Ebenso waren die für die numerischen und strukturellen chromosomalen Analysen der hiPSCs durchgeführten Karyotypisierungen bei allen der oben genannten Zelllinien in Passage 9 unauffällig (**Abb. 12**). Erst ab Passage 21 fanden wir erste Veränderungen: Bei einer der untersuchten Zelllinien (hiPSC_wt_1) zeigte sich bei einem Klon ein Mosaik mit 47 XXX, bei einem anderen Klon ein Mosaik mit Trisomie 8.

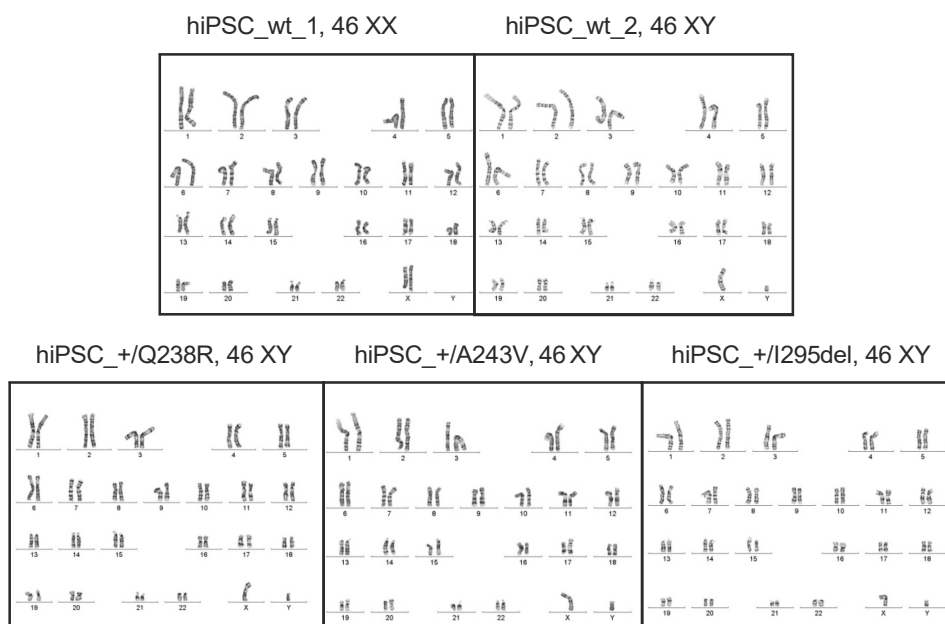


Abb. 12: Karyogramme. Unauffällige Karyogramme der hiPS-Zellreihen (hiPSC_wt_1_c1: 46 XX, hiPSC_wt_2_c1: 46 XY, hiPSC_+/Q238R_c1: 46 XY, hiPSC_+/A243V_c1: 46 XY, hiPSC_+/I295del_c1: 46 XY) bei Passage 9, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Johanna Käsbauser, Zentrum für Humangenetik, Regensburg. HiPSC_wt_1, 46 XX wurde bereits veröffentlicht in Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

5.5.3. RNA-Expressionsprofil

Um die hiPSCs genauer zu analysieren, wurden im Folgenden RT-PCR und qRT-PCR durchgeführt. Bei den RT-PCR Messungen wurden die 5 hiPSC-Linien semiquantitativ mit den entsprechenden Fibroblasten-Zelllinien verglichen, wobei insgesamt ein RNA-Expressionsprofil mit 9 Markern erstellt wurde. Stammzellmarker, wie die Transkriptionsfaktoren POU class 5 homebox 1 (*OCT4*), SRY [sex determining region Y]-box 2 (*SOX2*) und Nanog homebox (*NANOG*), die eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbster-

neuerung undifferenzierter Stammzellen spielen, wurden in allen 5 hiPSC-Linien stark exprimiert. Gleiches zeigte sich bei telomerase reverse transcriptase (*TERT*), undifferentiated embryonic cell transcription 1 (*UTF1*), zinc finger protein (*REX1*) und DNA (cytosine-5) methyltransferase 3 beta (*DNMT3B*). Dagegen waren diese Marker in der Fibroblasten-RNA, mit Ausnahme von *OCT 4*, das auch hier leicht exprimiert wurde, nicht vorhanden. Die Expression des Bindegewebs-Markers collagen type I, alpha 1 (*Col1a1*) war dagegen in den Stammzell-Linien im Vergleich zu den Fibroblasten-Linien deutlich herunterreguliert. Zur Kontrolle diente glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), die sowohl in Fibroblasten- als auch hiPSC-RNA zu finden war (**Abb. 13**).

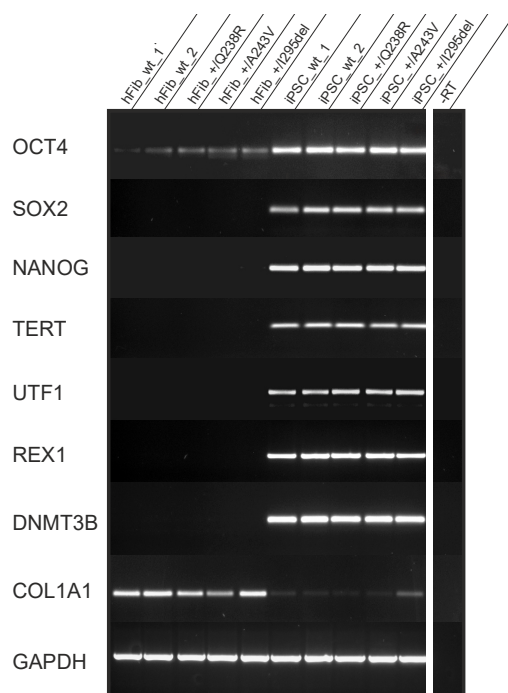


Abb. 13: RNA-Expressionsprofil der Fibroblasten- und hiPSC-Linien. Gesamt-RNA wurde sowohl aus den 5 Fibroblasten-Zelllinien (*hFib_wt_1_c1*, *hFib_wt_2_c1*, *hFib_+/Q238R_c1*, *hFib_+/A243V_c1*, *hFib_+/I295del_c1*) als auch aus den entsprechenden 5 hiPS-Zelllinien (*hiPSC_wt_1_c1*, *hiPSC_wt_2_c1*, *hiPSC_+/Q238R_c1*, *hiPSC_+/A243V_c1*, *hiPSC_+/I295del_c1*) isoliert. Die semiquantitativen RT-PCR-Messungen wurden mit genspezifischen Primern (**Tab. 4**) durchgeführt und via 2 %-iger Agarose-Gel-Elektrophorese (45 min, 150 Volt) analysiert. Als Primer dienten Stammzellmarker *OCT 4*, *SOX2*, *NANOG*, *TERT*, *UTF1*, *REX1* und *DNMT3B*, sowie der Bindegewebs-Marker *COL1A1*. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* verwendet, als Negativkontrolle diente die *-RT* (= Gesamt-RNA ohne Reverse Transkriptase). Quelle: Stephanie Zimmermann, Ausschnitte bereits veröffentlicht in Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

Die Pluripotenz der hiPSCs wurde auch mittels qRT-PCR unter Verwendung des TaqMan hPSC Scorecard Panel anhand vorgegebener, stammzellspezifischer qRT-PCR Daten sowie cloud-basierter Analysesoftware beurteilt. Es stellte sich heraus, dass die Expressionsprofile der getesteten Zelllinien *hiPSC_wt_1*, *hiPSC_+/Q238R* und *hiPSC_+/A243V* mit den Referenzwerten pluripotenter Zellen vergleichbar waren (**Abb. 14**).

Score Card Values

Sample Name	Cell Type	Pluripotent	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
hiPSC_wt_1	Pluripotent	0.22	-2.69	-0.36	-1.50
hiPSC_+/Q238R	Pluripotent	0.52	0.95	0.16	-0.86
hiPSC_+/A243V	Pluripotent	0.63	-1.63	-0.17	-1.28

Gene expression relative to the reference standard

Upregulated			Comparable			Downregulated
$x > 1.5$	$1.0 < x \leq 1.5$	$0.5 < x \leq 1.0$	$-0.5 \leq x \leq 0.5$	$-1.0 \leq x < -0.5$	$-1.5 \leq x < -1.0$	$x < -1.5$

Abb. 14: Pluripotenzanalyse mittels qRT-PCR und TaqMan hPSC Scorecard Panel. Diese bestätigte die Pluripotenz aller getesteten Stammzellreihen (roter Rahmen). Die Auswertung erfolgte anhand vorgegebener, stammzellspezifischer qRT-PCR Daten sowie cloud-basierter Analysesoftware. Quelle: Stephanie Zimmermann, Ausschnitte bereits veröffentlicht in Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

5.5.4. Proteinexpressionsprofil

Die Resultate der Immunofluoreszenz-Färbungen zeigten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der RT-PCR- und qRT-PCR Messungen, dass hiPSCs positiv für Antikörper gegen *NANOG* und *OCT4* sowie die stammzellspezifischen Zelloberflächenantigene *SSEA3* und *TRA1-60* waren. Dagegen zeigten HEK 293 Zellen, die als Kontrollen dienten, keine Expression dieser Stammzellmarker. Negativkontrollen („Kontrolle“), bei denen die primären Antikörper durch 1 x PBS ersetzt wurden, bestätigten die Spezifität der verwendeten Antikörper. Die Zellkerne lieferten hierbei jeweils ein positives Signal für den DNA-Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (*DAPI*) (**Abb. 15**).

Zusammenfassend zeigte sich somit, dass die 5 Fibroblasten-Zelllinien (hFib_wt_1, hFib_wt_2, hFib_+/Q238R, hFib_+/A243V, hFib_+/I295del) erfolgreich zu hiPSC-Linien (hiPSC_wt_1, hiPSC_wt_2, hiPSC_+/Q238R, hiPSC_+/A243V, hiPSC_+/I295del) reprogrammiert worden waren, die sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene ein typisches Stammzellmarker-Expressionsprofil aufwiesen.

Auf diese Weise gelang es uns schließlich 5 hiPSC-Linien zu etablieren (**Tab. 1**). Insgesamt handelte es sich um zwei Kontrolllinien (hiPSC_wt_1, hiPSC_wt_2) und drei Zelllinien mit heterozygoten Mutationen im *BEST1* Gen (hiPSC_+/Q238R, hiPSC_+/A243V, hiPSC_+/I295del).

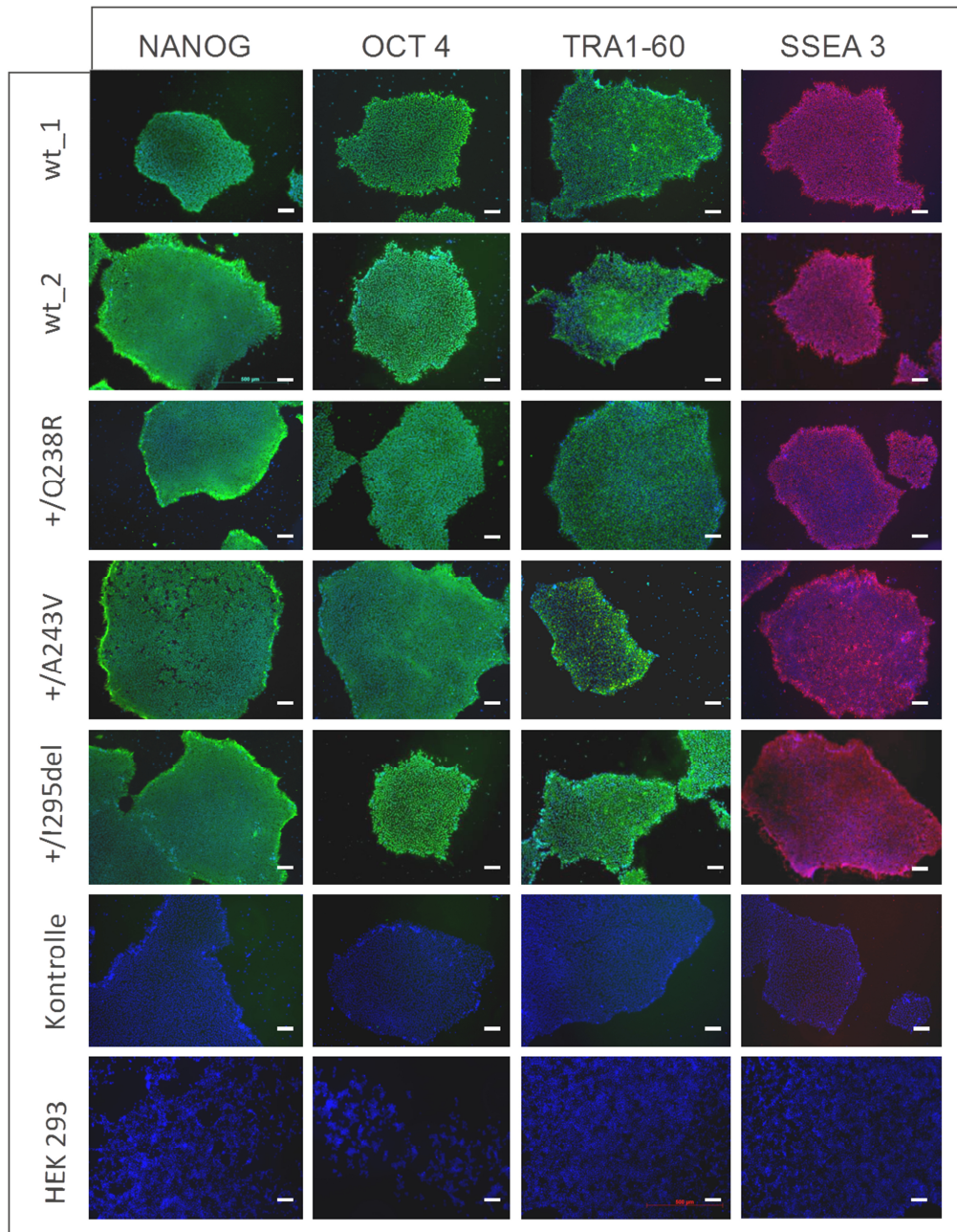


Abb. 15: Proteinexpressionsprofil der hiPSCs. Die 5 hiPSC-Linien (hiPSC_wt_1_c1, hiPSC_wt_2_c1, hiPSC_+/Q238R_c1, hiPSC_+/A243V_c1, hiPSC_+/I295del_c1) wurden jeweils gegen NANOG (grün), OCT4 (grün), TRA1-60 (grün) und SSEA3 (rot) gefärbt. Für die Negativkontrolle („Kontrolle“) wurde der primäre Antikörper durch 1x PBS ersetzt. DAPI (blau), Maßstabsbalken: 100 μ m. Als Kontrolle wurden außerdem HEK 293 Zellen mit Antikörpern gegen NANOG (grün), OCT4 (grün), TRA1-60 (grün) und SSEA3 (rot) gefärbt, die für die Expression aller Stammzellproteine negativ waren. Gezeigt sind Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop2 mot plus (Zeiss). Quelle: Stephanie Zimmermann, Ausschnitte modifiziert bereits veröffentlicht in Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

5.6. In vitro-Differenzierung

5.6.1. Protokoll nach Zhu, Carido et al. (2013)

Im nächsten Schritt wurden die hiPS-Zelllinien über die Generierung dreidimensionaler, neuroepithelialer Zysten nach Zhu, Carido et al. [69] in RPE umgewandelt. Hierfür benötigte man mindestens zwei konfluente 6-Well Platten monoklonaler hiPSCs-Zellen. Diese wurden, wie im Protokoll beschrieben (*vgl.* 4.1.4), zunächst in einen Matrigeltropfen überführt, wo sich aus ihnen in N2B27 Medium (**Tab. 11**) neuroepitheliale Zysten (**Abb. 17 A/B**) bildeten. An Tag 5 wurden die Zysten dann aufgezogen und auf Transwellfilter überführt, wo sie in RPE Zysten Medium (**Tab. 11**) zu funktionsfähigem RPE (hiPSC-ZRPE) heranreifen sollten. Diese Vorgehensweise konnte prinzipiell erfolgreich umgesetzt werden, war jedoch in unseren Versuchen wenig effektiv. Bereits bei der Erzeugung neuroepithelialer Zysten zeigten sich sowohl innerhalb der verschiedenen Zelllinien, als auch bei unterschiedlichen, aufeinander folgenden Ansätzen mit denselben Zelllinien, teils deutliche Unterschiede in Größe, Morphologie und Zahl der entstandenen Zysten. Dieses Phänomen ließ sich bei unseren Zellen auch in wiederholten Experimenten unter standardisierten Bedingungen nicht verbessern. Zudem war die Zellausbeute sehr gering. Bei einem Ansatz aus 2 vollständig mit hiPSCs bewachsenen 6-Well-Platten (insgesamt 12 Wells) erhielt man je Durchgang höchstens 2 – 3 Millionen Zellen. Diese konnten bei der anschließenden Differenzierung auf maximal 6 Filtermembranen einer 24-Well-Transwellfilter-Platte ausgesät werden, sodass sich die hiPSC-ZRPE-Kultur auf weniger als 5 % der ursprünglichen hiPSC-Kultur Fläche verkleinerte. Eine Passagierung war im Folgenden nicht mehr möglich. Es dauerte mehr als 40 Tage, bis sich die ersten Erfolge einstellten und einige Zellen zu pigmentieren begannen. Trotz wiederholter Versuche bildeten sich nur bei einer der fünf hiPS-Zelllinien, hiPSC_wt_1, tiefschwarze, hexagonale Zellen, die makroskopisch die gesamte Filtermembran bedeckten (**Abb. 17 C**). Bei den insgesamt 12 angesetzten 24-Well Transwellfilter dieser Zelllinie waren nur auf zwei Filtern schwarze Zellrasen entstanden (hiPSC_ZRPE_wt_1_c1 und hiPSC_ZRPE_wt_1_c2). Diese bildeten in unseren Versuchen keine homogenen Monolayer, sondern waren teils mehrschichtig, sodass sie bezüglich ihrer Morphologie unter dem Lichtmikroskop nur schwer beurteilt werden konnten. Die Zellen der übrigen Filter hatten sich zu diesem Zeitpunkt entweder bereits von den Filtermembranen gelöst, oder hatten unpigmentierte, mehrschichtige, teils völlig unstrukturierte Gewebsverbände gebildet.

Proteinexpressionsprofil

Bei der Analyse der pigmentierten Zellen (hiPSC_ZRPE_wt_1) waren die Immunofluoreszenz-Färbungen positiv für Antikörper, die gegen zonula occludens 1 (ZO-1), ein Protein der zytoplasmatischen Seite von tight junctions und das RPE-spezifische Protein BEST1 gerichtet waren. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie (**Abb. 16**) konnte ZO-1 apikal, BEST1 dagegen an der basolateralen Seite der Plasmamembran nachgewiesen werden (**Abb. 17 D-G**).

Abb. 16: Schema der Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop LSM510. Zur präzisen Analyse des endogenen BEST1 wurden Schichtaufnahmen (Z-Stacks) angefertigt, die mit Hilfe des apikalen, membranständigen ZO-1 (rot) eine genaue Lokalisation des BEST1 (grün) bezüglich Zytosol und Plasmamembran erlaubten. Hellgrau: Zellkerne, dunkelgrau: intrazelluläre Granula, hellblau: Z-Stacks. Roter Pfeil: Richtung der Schichtbildaufnahmen. Quelle: Stephanie Zimmermann.

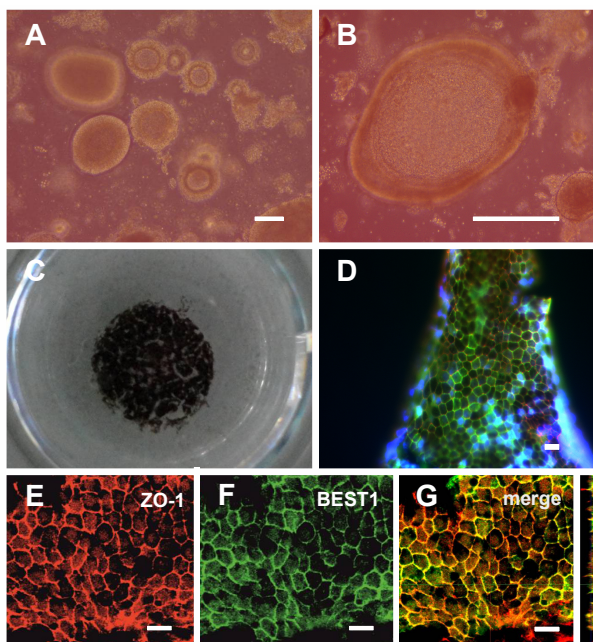
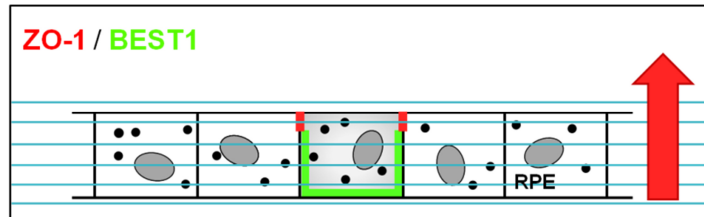


Abb. 17: In vitro-Differenzierung der Zelllinie hiPSC_wt_1_c1 zu hiPSC_ZRPE_wt_1_c1 über neuroepitheliale Zysten. **A-B:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme ovaler dreidimensionaler neuroepithelialer Zysten nach 5 Tagen im Matrigeltropfen auf einem Glasplättchen. Maßstabsbalken: 100µm. **C:** Makroskopische Aufnahme eines stark pigmentierten Zellrasens (hiPSC_ZRPE_wt_1_c1_p0) auf einem 24-Well Transwellfilter nach 2 monatiger Kultivierung. **D-G:** Antikörperfärbungen der Zelllinie hiPSC_ZRPE_wt_1_c1_p0 3 Monate nach Differenzierungsbeginn gegen den RPE-spezifischen Marker BEST1 (grün), den tight junction Marker ZO-1 (rot) und DAPI (Blau). Gezeigt sind Aufnahmen mit Fluoreszenzmikroskop Axioskop2 mot plus (G) sowie x-y und x-z Projektionen, aufgenommen mit dem konfokalen Mikroskop LSM510 (E-G). Maßstabsbalken: 20 µm. Quelle: Stephanie Zimmermann.

Transepithelialer Widerstand (TER)

Ein Anstieg des transepithelialen Widerstandes, der mit Zellreife, der Expression des BEST1 Proteins und einem funktionalen tight-junction Komplex korrelierte, konnte bei keiner der Zelllinien (hiPSC_ZRPE_wt_1, hiPSC_ZRPE_wt_2, hiPSC_ZRPE_+/Q238R, hiPSC_ZRPE_+/A243V, hiPSC_ZRPE_+/I295del) nachgewiesen werden (**Abb. 18**). Auch bei hiPSC_ZRPE_wt_1 kam es zu keinem Anstieg, obwohl auf Proteinebene eine Expression von BEST1 und ZO-1 nachgewiesen worden war (**Abb. 17**).

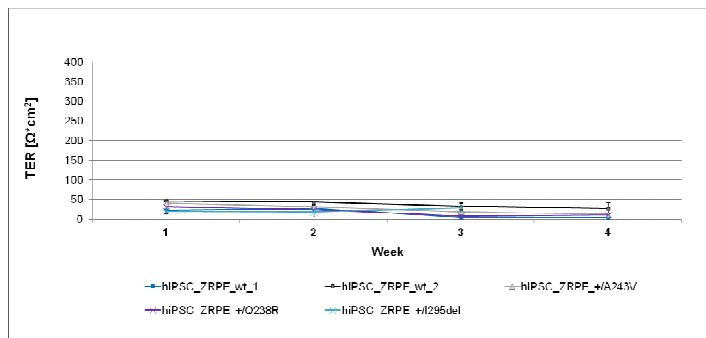


Abb. 18: TER Zysten. Auch 4 Wochen nach Beginn der Differenzierung kam es zu keinem Anstieg der transepithelialen Widerstände innerhalb der hiPSC-ZRPE (hiPSC_ZRPE_wt_1_c1_p0, hiPSC_ZRPE_wt_2_c1_p0, hiPSC_ZRPE_+/Q238R_c1_p0, hiPSC_ZRPE_+/A243V_c1_p0, hiPSC_ZRPE_+/I295del_c1_p0). TER wurde in

$\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Jeder Messpunkt gibt den Mittelwert \pm SD von mindestens drei biologischen Replikaten an.

Quelle: Stephanie Zimmermann.

Aus Mangel an Zellmaterial konnten keine weiteren Charakterisierungen, wie die Erstellung eines RNA-Expressionsprofils oder funktionelle Analysen, vorgenommen werden. Insgesamt erwies sich dieses Protokoll auf Grund seiner geringen Effizienz und Reproduzierbarkeit in den hier durchgeführten Experimenten als eher ungeeignet.

5.6.2. Protokoll nach Krohne, Westenskow et. al. (2012)

Bei diesem Protokoll [66] erfolgte die Differenzierung der für 12 – 14 Tage in mTeSR®1 bis zur Konfluenz kultivierten hiPSCs über eine Umstellung des Mediums unter Zugabe von 10 mM Nicotinamid sowie 62 ng/ml Activin A. Etwa acht Wochen nach eingeleiteter Differenzierung erschienen bei allen 5 Zelllinien innerhalb der sich differenzierenden hiPSCs pigmentierte Zellcluster (**Abb. 20 A**), die unter dem Mikroskop als einschichtiges, kubisches Epithel imponierten (**Abb. 20 B**). Sie konnten mit einem Skalpell exzidiert und mittels 0.05 % Trypsin EDTA aufgezogen werden, um im Folgenden entweder auf mit gfr-Matrigel beschichteten Transwellfiltern oder mit gfr-Matrigel beschichteten Zellkulturplatten subkultiviert zu werden. Nach 6 Wochen zeigte sich, dass hiPSC-abgeleitetes RPE, welches unipolar auf Zellkulturplatten kultiviert worden war, eine deutlich unregelmäßigere Morphologie aufwies und sich zum Teil bereits von der Unterlage zu lösen begann. Dagegen konnte polar

auf Transwell Filtern kultiviertes hiPSC-abgeleitetes RPE bis zu 6 Monaten heranreifen, ohne dass es passagiert werden musste.

Das Protokoll nach Krohne, Westenskow et al. (2012) [66] führte auch in wiederholten Experimenten bei 4 der 5 hiPS-Zelllinien zum Auswachsen pigmentierter, hexagonaler Zellen, die sich durch Ausschneiden und anschließendes Passagieren weiter aufreinigen ließen (**Abb. 19**). Hierbei zeigten sich Unterschiede innerhalb der einzelnen Zelllinien, sodass sowohl reine hiPSC-abgeleitete RPE-Kulturen, als auch Mischkulturen aus hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen und einem geringen Anteil an undifferenzierten Zellen entstanden. Allein bei der Zelllinie hiPSC_+/I295del gelang es auch in mehreren Versuchen unter standardisierten Bedingungen nicht, mikroskopisch weitgehend reines RPE zu generieren.

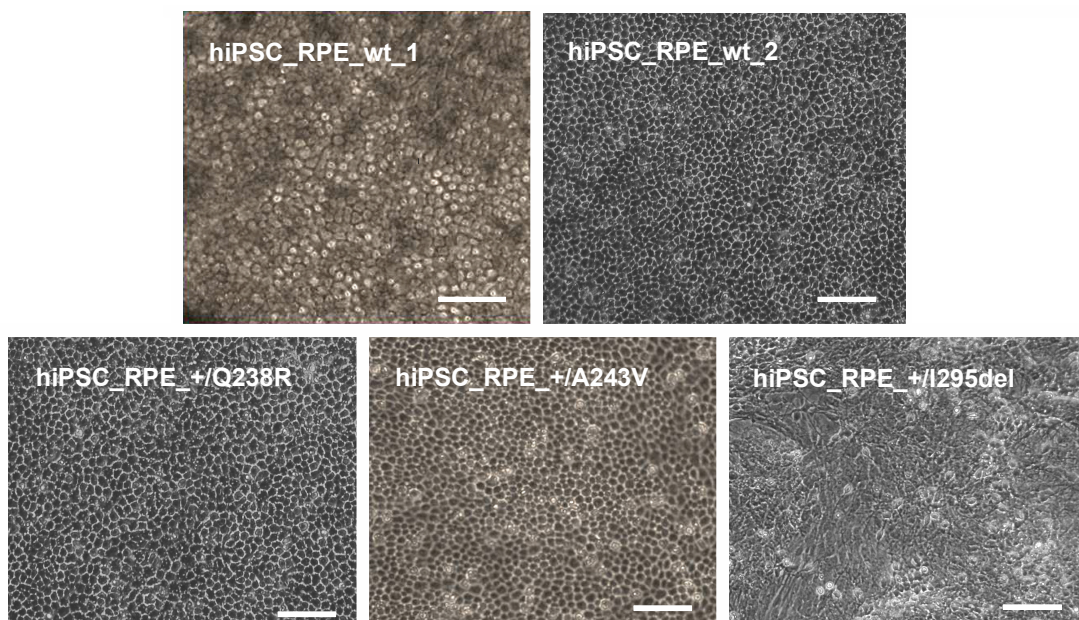


Abb. 19: Durchlichtmikroskopische Aufnahme aller hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien (hiPSC_RPE_wt_1_c1_p1, hiPSC_RPE_wt_2_c1_p1, hiPSC_RPE_+/Q238R_c1_p1, hiPSC_RPE_+/A243V_c1_p1 und hiPSC_RPE_+/I295del_c1_p1). Mit Ausnahme von hiPSC_RPE_+/I295del zeigten sich bei allen anderen Linien einschichtige Zellrasen mit RPE-typischen, hexagonalen Zellen, die teilweise pigmentiert waren. Bei hiPSC_RPE_+/I295del fand sich dagegen ein völlig unstrukturierter Zellverband mit massiven Verunreinigungen in Form spindelförmiger, irregulärer Zellen, die die Ausbildung eines homogenen Monolayers verhinderten. Auch in wiederholten Differenzierungsansätzen gelang es bei dieser Zelllinie nicht, weitgehend reine hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen zu erzeugen. Maßstabsbalken: 100 µm. Quelle: Stephanie Zimmermann.

Das auf diese Weise gewonnene hiPSC-abgeleitete RPE konnte problemlos 2 bis 3 Mal passagiert werden (**Abb. 20 C**). Allerdings verlor es ab Passage 5 allmählich seine gleich-

mäßige, hexagonale Morphologie durch einen Zugewinn unregelmäßiger Zellareale. Zu diesem Zeitpunkt konnten wir außerdem einen deutlichen Rückgang in Zellwachstum und Teilungsrate feststellen. Obwohl alle Zelllinien zwischen Passage 1 und 3 ihre typische Morphologie beibehielten, kam es nicht in allen Fällen zu erneuter Pigmentierung (**Abb. 20 D**). Diese konnte nach 4 - 6 Wochen nur bei 2 der 4 Zelllinien, hiPSC_RPE_wt_1 und hiPSC_RPE_+/Q238R, beobachtet werden.

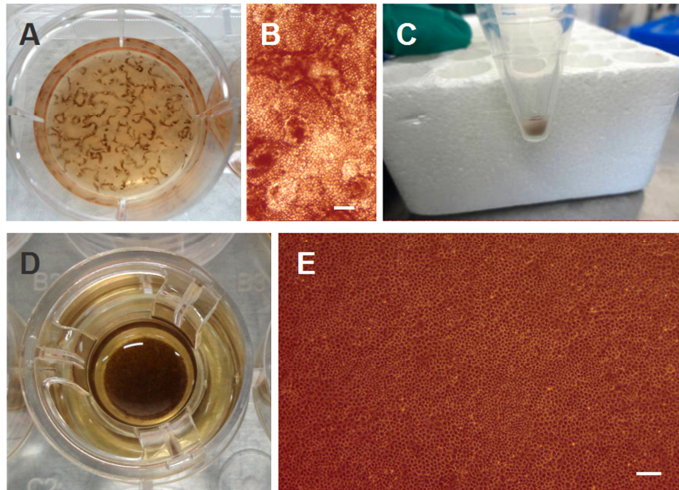


Abb. 20: Passagierung des hiPSC-abgeleiteten RPE, hier hiPSC_RPE_wt_1_c1. **A:** Etwa 8 Wochen nach Beginn der Differenzierung zeigten sich innerhalb des Zellverbandes etwa 25 – 40 unregelmäßige, über das gesamte Well verstreute, stark pigmentierte Zellcluster. Abbildung bereits veröffentlicht in Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5]. **B:** Unter dem Lichtmikroskop imponierten diese dunklen Zellareale bereits mit RPE-typischer, hexagonaler Morphologie. **C:** Durch die starke Pigmentierung der Pellets ließ sich die

Zellkultur auch bei der Passagierung durch vorsichtiges Absaugen der aufliegenden, helleren Schichten weiter aufreinigen. **D:** Während die passagierten Zellen zunächst ihre Farbe verloren, konnte nach 4 – 6 Wochen vereinzelt eine erneut einsetzende Pigmentierung beobachtet werden, hier hiPSC_RPE_wt_1_c1_p2. **E:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme eines gleichmäßig hexagonalen Zellrasens, der das gesamte Well bedeckte (hiPSC_RPE_wt_1_c1_p3). Auch innerhalb unpigmentierter Areale ließ sich die RPE-typische Zellmorphologie erkennen. Maßstabsbalken je 100 µm. Quelle: B-E: Stephanie Zimmermann.

Insgesamt schien dieses Protokoll vielversprechend, da es in unseren Versuchen eine hohe Effizienz und Zellausbeute aufwies und es zudem möglich war, das daraus gewonnene hiPSC-abgeleitete RPE zu passagieren.

5.7. Charakterisierung von hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen

5.7.1. RNA-Expressionsprofil

Um die hiPSC-abgeleiteten RPE-Zelllinien genauer zu charakterisieren, wurden im Folgenden RNA-Expressionsanalysen mittels RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die 5 hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien semiquantitativ sowohl mit den entsprechenden hiPSC-Linien als auch

mit nativem humanem RPE verglichen, wobei insgesamt ein Expressionsprofil mit 6 Markern erstellt wurde (**Abb. 21**). Es zeigte sich, dass hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen ein ähnliches RNA-Expressionsprofil aufwiesen wie humane RPE-Zellen. RPE-spezifische Primer, wie das retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa (*RPE65*), *BEST1* und das retinaldehydrogenbinding protein 1 (*RLBP1*) sowie der melanogenesis marker tyrosinase (*TYR*) wurden sowohl in den hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen, als auch in nativem humanem RPE exprimiert, nicht jedoch in den zu Grunde liegenden hiPSCs. Im Gegenzug fanden wir sowohl bei hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen als auch bei humanem RPE einen Rückgang der Expression des Stammzellmarkers *NANOG*, der in den entsprechenden hiPSC-Linien als Zeichen der Pluripotenz noch stark exprimiert wurde.

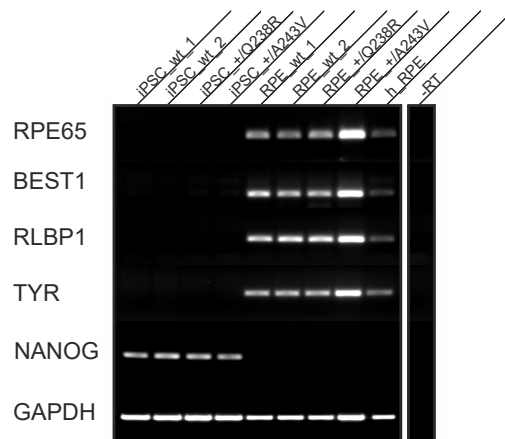


Abb. 21: RNA-Expressionsprofil aller hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien. Gesamt-RNA wurde sowohl aus den 4 hiPSC-Linien (*hiPSC_wt_1_c1*, *hiPSC_wt_2_c1*, *hiPSC_+/Q238R_c1*, *hiPSC_+/A243V_c1*) als auch aus den entsprechenden 4 hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien (*hiPSC_RPE_wt_1_c1*, *hiPSC_RPE_wt_2_c1*, *hiPSC_RPE_+/Q238R_c1*, *hiPSC_RPE_+/A243V_c1*) isoliert. Die semiquantitativen RT-PCR-Messungen wurden mit genspezifischen Primern (**Tab. 4**) durchgeführt und via 2 %-iger Agerose-Gel-Elektrophorese (45 min, 150 Volt) analysiert. Als Primer dienten die RPE-spezifischen Marker RPE 65, *BEST1* und *RLBP1* sowie der Melanogesismarker *TYR* und der Stammzellmarker *NANOG*. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* verwendet, als Negativkontrolle diente die -RT (= Gesamt-RNA ohne Reverse Transkriptase). Quelle: Stephanie Zimmermann.

spezifischen Marker RPE 65, *BEST1* und *RLBP1* sowie der Melanogesismarker *TYR* und der Stammzellmarker *NANOG*. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* verwendet, als Negativkontrolle diente die -RT (= Gesamt-RNA ohne Reverse Transkriptase). Quelle: Stephanie Zimmermann.

5.7.2. Proteinexpressionsprofil

Die Ergebnisse der Immunofluoreszenz-Färbungen von *hiPSC_wt_1* zeigten das Vorhandensein des tight junction markers ZO-1 sowie des RPE-spezifischen Proteins *BEST1*. Es wurden dabei ganze 12-Well Filtermembranen gefärbt, auf denen jede einzelne Zelle ein positives Signal für die beiden Proteine ZO-1 und *BEST1* lieferte. Wir verglichen die unpolar auf Glasplättchen in Zellkulturschalen gezüchteten hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen mit den polar auf Filtersystemen kultivierten hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen bezüglich ihres Proteinexpressionsprofils. Während ZO-1 mittels konfokaler Mikroskopie in beiden Fällen an der apikalen Plasmamembran nachgewiesen werden konnte, schien *BEST1* bei hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen, welche unpolar auf Glasplättchen kultiviert worden waren, teils auch innerhalb des Zytoplasmas der Zellen verteilt zu sein (**Abb. 22 B**). Dagegen zeigte *BEST1*

nach zweimonatigem, polarem Wachstum des hiPSC-abgeleiteten RPE auf Transwellfiltern eine primär an der basolateralen Plasmamembran befindliche Lokalisation (**Abb. 22 A**). Wir beobachteten zudem, dass innerhalb der Zellverbände des in Zellkulturschalen ohne Filtersysteme gezüchteten, hiPSC-abgeleiteten RPE zum Teil große Lücken entstanden waren.

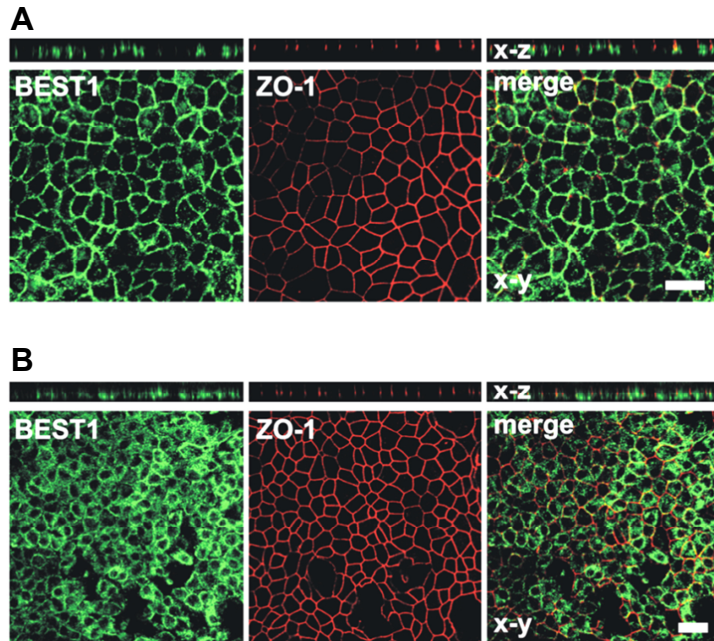


Abb. 22: Proteinexpressionsprofil von hiPSC_RPE_wt_1 auf Transwellfiltern und Glasplättchen mit Antikörpern gegen den RPE-spezifischen Marker BEST1 (grün) und den tight junction marker zonula occludens 1 (ZO-1, rot). **A:** X-y und x-z Projektionen von polarem hiPSC_RPE_wt_1_c1 bei Passage 4, das zwei Monate lang auf Transwellfiltern kultiviert worden war. Während ZO-1 eine apikale Lokalisation aufwies, konnte BEST1 an der basolateralen Plasmamembran detektiert werden **B:** X-y und x-z Projektionen von unpolar auf Glas-

plättchen kultiviertem hiPSC_RPE_wt_1_c1. ZO-1 behielt auch hier seine typisch apikale Lokalisation bei. Endogenes BEST1 konnte jedoch weitaus weniger streng nur der basolateralen Plasmamembranseite zugeordnet werden, sondern war teils auch diffus im Zytoplasma der Zellen zu finden. Zudem zeigten sich innerhalb des Zellrasens vermehrt Gewebslücken, die durch vorzeitiges Absterben einzelner Zellen entstanden waren. Maßstabsbalken je 20 μm . Aus Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

5.7.3. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Um die ultrastrukturellen Merkmale der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen als Hinweis auf funktionstüchtiges Gewebe untersuchen zu können, fertigten wir Aufnahmen mit dem Rasterelektronen-Mikroskop. Für bestmögliches Bildmaterial betrachteten wir die Zellen sowohl in feuchtem Zustand im low vac-, als auch getrocknet im high vac modus.

Die Aufnahmen des hiPSC-abgeleiteten RPE von apikal im low vac modus zeigten ein homogenes Bild hexagonaler Zellkörper, deren Oberflächen zum Teil glatt und porös, zum Teil mit vielen, kurzen Ausstülpungen besetzt zu sein schienen (**Abb. 23 C/D**).

Die Fotografien im high vac modus lieferten dagegen sehr detaillierte Oberflächenaufnahmen. Man erkannte apikale Mikrovilli, die sich in Form von ca 0,1 μm dicken und etwa 2 μm

langen, fadenförmigen Fortsätzen über den gesamten Zellrasen erstreckten. Allerdings verhinderten diese teilweise eine gute Abgrenzung der hexagonalen Zellkörper, da sie sich wie ein Teppich über den gesamten Zellrasen legten. Durch den Schritt der Kritisch-Punkt-Trocknung ergaben sich hier vereinzelt Trocknungsartefakte, die zu einer Spaltbildung zwischen den einzelnen Zellkörpern führten (**Abb. 23 A/B**).

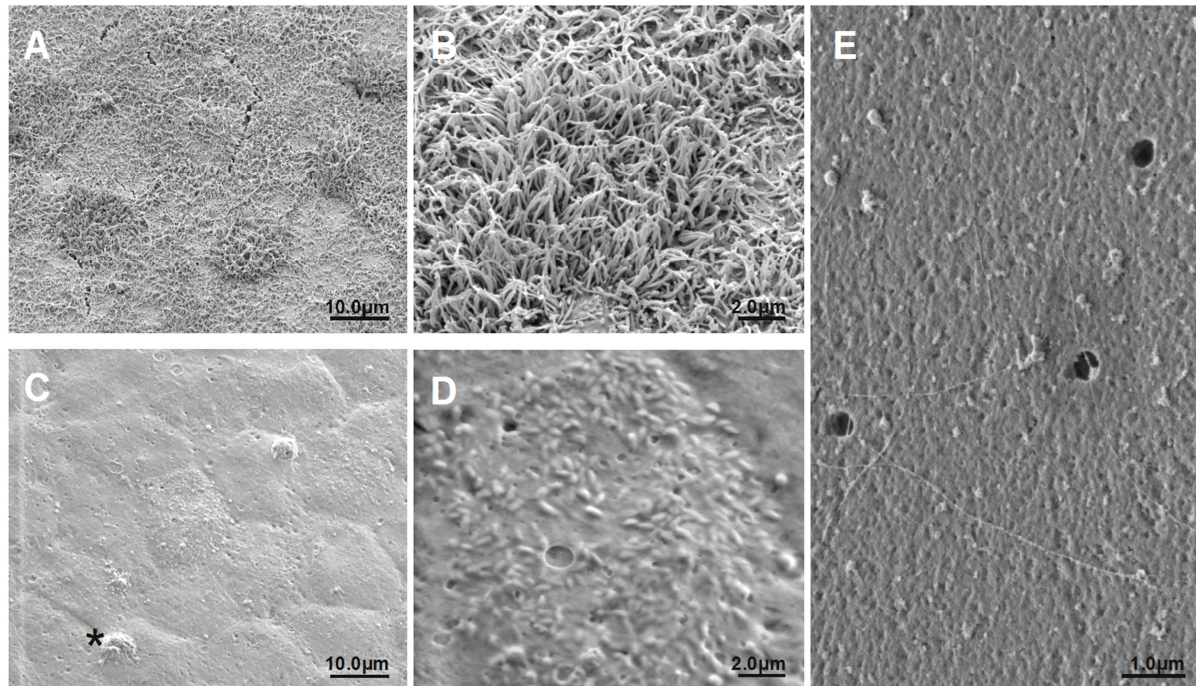


Abb. 23: Rasterelektronenmikroskopie von 2 Monaten auf Transwellfilter kultiviertem hiPSC_RPE_wt_1_c1_p4. **A/B:** Aufnahmen im high vac modus von apikal in unterschiedlicher Vergrößerung. **A:** HiPSC-abgeleiteter RPE-Zellrasen mit typisch hexagonalen Zellkörpern sowie apikalen Mikrovilli, die den kompletten Zellrasen überziehen. Durch die Kritisch-Punkt-Trocknung ergaben sich vereinzelt Trocknungsartefakte, die mit Spaltbildung zwischen den einzelnen Zellkörpern einhergingen. **B:** Bei genauer Betrachtung zeigt sich der hexagonale Zellkörper einer einzelnen RPE-Zelle, deren Abgrenzung durch die apikalen Mikrovilli erschwert ist. **C/D:** Aufnahmen im low vac modus von apikal in unterschiedlicher Vergrößerung. **C:** Darstellung der regelmäßig hexagonalen Struktur des hiPSC-abgeleiteten RPE-Rasens in physiologischem (feuchtem) Zustand. Die vereinzelt auftretenden Vakuolen (*) stellen vermutlich alte, sich bereits von der Filtermembran ablösende, Zellkörper dar. **D:** Hexagonaler Zellkörper der in Abbildung C zentral gelegenen RPE Zelle im low vac modus in höherer Vergrößerung. Die apikalen Mikrovilli wurden im low vac modus durch den vorhandenen Flüssigkeitsfilm auf die Zelloberfläche gedrückt. **E:** Unterseite einer bewachsenen Transwell-Filtermembran mit 3 Membranporen im high vac modus. Maßstabsbalken wie angegeben. Alle Bilder wurden dankenswerterweise in Kooperation mit Fr. PD Dr. Federlin, Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universitätsklinikum Regensburg, erstellt.

5.7.4. Transepithelialer Widerstand

Um eine Aussage über den Entwicklungsstand und die Funktionsfähigkeit der auf den Filtern polar wachsenden Zellen treffen zu können, wurde einmal wöchentlich der transepitheliale Widerstand gemessen (TER), der mit Zellreife und Bestrophinexpression korrelierte. Innerhalb eines Kultivierungszeitraums von etwa 3 Monaten, in dem ausschließlich Medienwechsel erfolgte, zeigte sich bei allen Zellreihen (hiPSC_RPE_wt_1, hiPSC_RPE_wt_2, hiPSC_RPE_+/Q238R, hiPSC_RPE_+/A243V) während der ersten 6 bis 8 Wochen ein enormer Anstieg der transepithelialen Widerstände, teilweise auf mehr als $600 \Omega/\text{cm}^2$. Diese Werte blieben für mindestens 12 weitere Wochen auf einem konstant hohen Niveau. Bei hiPSC-abgeleitetem RPE höherer Passagen konnte man jedoch einen Rückgang der gemessenen Widerstände feststellen (**Abb. 24**).

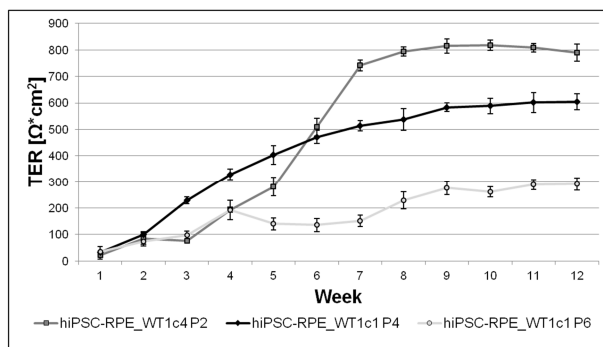


Abb. 24: TER von hiPSC_RPE_wt_1 bei unterschiedlichen Passagen. Es zeigte sich ein Abfall der gemessenen Widerstände und Widerstandsmaxima bei höheren Passagen (p2: $> 800 \Omega \cdot \text{cm}^2$, p4: $\leq 600 \Omega \cdot \text{cm}^2$, p6: $\leq 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$). TER wurde in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert von mindestens drei biologischen Replikaten \pm SD dar. Aus Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

5.7.5. Fütterungsexperimente mit Photorezeptoraußensegmenten (POS)

In einer Zeitreihe von 1,5 h, 6 h und 24 h fütterten wir 2 Monate lang auf Transwellfiltern kultiviertes hiPSC_RPE_wt_1_c1_p4 mit etwa 20 POS/Zelle. Wir fanden dabei eine Zunahme der phagozytierten POS entsprechend den längeren Inkubationszeiten, was wir mit Hilfe des konfokalen Mikroskops qualitativ wie quantitativ analysierten. Nach 1,5 h waren etwa 236 POS ($\pm 21,20$ SD pro $0,05 \text{ mm}^2$) von den Zellen aufgenommen worden, was sich durch eine Inkubationszeit von 6 h noch deutlich steigern ließ (762 POS Signale $\pm 26,51$ SD pro $0,05 \text{ mm}^2$; $p = 8,63\text{E-}07$ [p-Wert, Student's t-Test]). Zwischen 6 h und 24 h zeigte sich eine Verlangsamung der Phagozytose-Aktivität (941 POS Signale $\pm 143,07$ SD pro $0,05 \text{ mm}^2$; $p = 0,10$), wobei nach 24 h bereits mehr POS zerkleinert und von den hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen teils verdaut worden waren, als zu früheren Zeitpunkten (**Abb. 25** und **Abb. 26**).

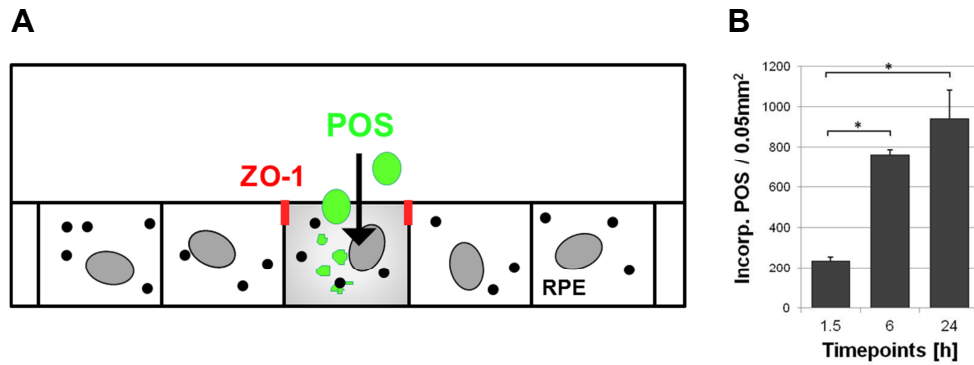


Abb. 25: POS-Phagozytose und Aufnahmekapazität von hiPSC_RPE_wt_1. **A:** Schema der POS-Phagozytose. Anhand der Lokalisation von ZO-1(rot) konnten später mit Hilfe von Schichtbildaufnahmen (z-stacks) durch konfokalen Mikroskopie Aussagen über Anzahl und Verteilung der POS innerhalb der RPE-Zellen gewonnen werden. Grün: POS, hellgrau: Zellkerne, dunkelgrau: intrazelluläre Granula. Quelle: Stephanie Zimmermann. **B:** Quantitative Analyse der POS Phagozytosekapazität von hiPSC_RPE_wt_1_c1_p4. Die zu den drei Zeitpunkten (1,5h, 6h, 24h) aufgenommenen POS wurden in konfokalen Bildern automatisch ermittelt. Jeder Balken repräsentiert dabei einen Mittelwert \pm SD von sechs 0,05 mm² großen Bildausschnitten. (* = Student's t test: $p \leq 0,05$). Aus Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

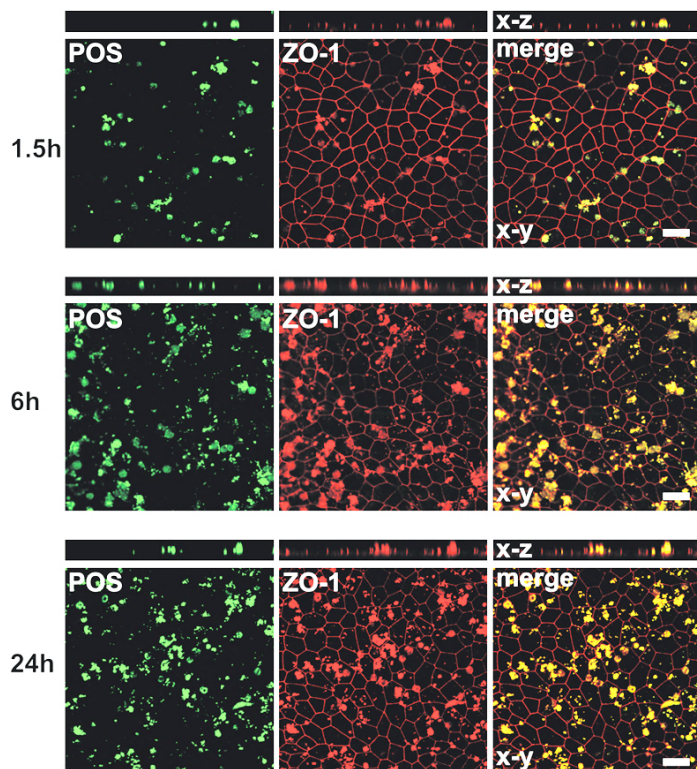


Abb. 26: Analyse der POS-Phagozytose von hiPSC_RPE_wt_1 mittels konfokaler Mikroskopie. HiPSC-abgeleitetes RPE wurde 1,5h, 6h und 24h mit fluoreszenzmarkierten POS in einer Konzentration von 20 POS/Zelle inkubiert. Die apikale Färbung des ZO-1 (rot) ließ hierbei Rückschlüsse auf die relative Lokalisation der frisch aufgenommenen (homo- gen, rund) und teilweise verdauten POS (kleiner, irregulär) zu. Gezeigt sind x-y und x-z Projektionen von hiPSC_RPE_wt_1_c1 bei Passage 4, das 2 Monate lang auf Transwellfiltern kultiviert worden war. Maßstabsbalken: 20 μ m. Aus Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

5.7.6. Kryokonservierung

HiPSC-abgeleitete RPE-Zellen wurden im Stickstoffturm bei -180°C kryokonserviert. Um die Unversehrtheit der Zellen postcryo überprüfen zu können, wurden diese aufgetaut und auf Transwellfilter ausgesät. Nach einem Zeitraum von etwa 4 Wochen bildete sich hieraus erneut einen geschlossener Rasen hexagonaler Zellen (**Abb. 27**).

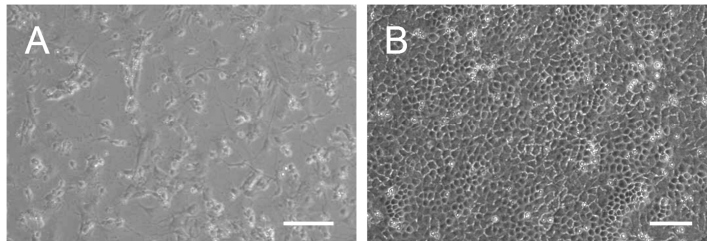


Abb. 27: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von hiPSC_RPE_wt_1 postcryo. **A:** HiPSC_RPE_wt_1_c1_p4 drei Tage postcryo: es ist noch kein vollständig ausgebildeter Zellrasen erkennbar, jedoch haben die hiPSC_RPE bereits feine Ausläufer gebildet und begonnen sich zu reorganisieren. **B:** Vier Wochen postcryo zeigte sich unter dem Lichtmikroskop schließlich ein geschlossener Zellverband mit fast vollständig wiederhergestellter, gleichmäßig hexagonaler RPE-Morphologie. Maßstabsbalken: 100 μm . Quelle: Stephanie Zimmermann.

Maßstabsbalken: 100 μm . Quelle: Stephanie Zimmermann.

Proteinexpressionsprofile zeigten, dass ZO-1 bei hiPSC_RPE_wt_1_c1_p4, welches postcryo 2 Monate lang polar auf Transwellfiltern kultiviert worden war, weiterhin an der apikalen Plasmamembran nachgewiesen werden konnte. Auch das Protein BEST1 schien nach wie vor exprimiert zu werden, war allerdings nicht mehr so streng an der basolateralen Plasmamembran der Zellen lokalisiert, wie noch vor dem Einfrieren der Zellen (**Abb. 28**).

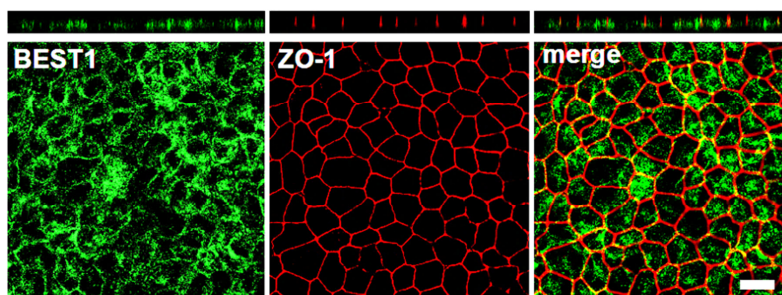


Abb. 28: Proteinexpressionsprofil von hiPSC_RPE_wt_1 postcryo. Der tight junction marker ZO-1 (rot) wies weiterhin eine apikale Lokalisation auf und bestätigte die Reorganisation eines geschlossenen Rasens hexagonaler RPE-Zellen postcryo.

Dagegen zeigte sich, dass endogenes BEST1 (grün) nicht mehr streng nur an der basolateralen Plasmamembran lokalisiert war, wie noch vor dem Einfrieren der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen, sondern teilweise auch innerhalb des Zytoplasmas vorhanden war. Zu sehen sind x-y und x-z Projektionen von hiPSC_RPE_wt_1_c1 bei Passage 4, das postcryo 10 Wochen lang auf Transwellfiltern kultiviert worden war. Maßstabsbalken: 20 μm . Aus Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

Auch postcryo tendierte der transepitheliale Widerstand nach einer kurzen Regenerationsphase (etwa 4 bis 6 Wochen) zu einem erneuten Anstieg, was neben der Morphologie einen

wichtigen Indikator für die funktionelle Unversehrtheit der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen darstellte (**Abb. 29**).

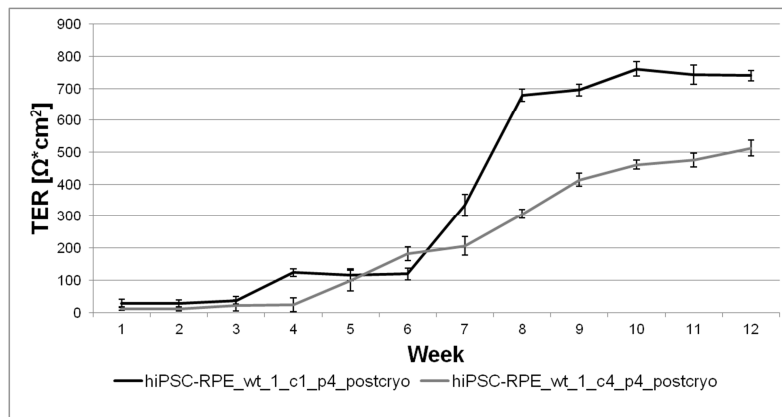


Abb. 29: TER von hiPSC_RPE_wt_1_postcryo. Dieser zeigte nach einer kurzen Regenerationsphase von etwa 4 bis 6 Wochen erneut einen starken Anstieg, teils auf Werte $> 700 \Omega^*cm^2$ (hiPSC_RPE_wt_1_c1_p4_postcryo). TER wurde in Ω^*cm^2 angegeben. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert von mindestens drei biologischen Replikaten \pm SD dar. Abgeändert aus Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

katen \pm SD dar. Abgeändert aus Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5].

5.7.7. Vergleich von hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen mit normalem und mutiertem *BEST1*

Einen ersten Schritt in der Erforschung der mutanten Zelllinien stellte die immunzytochemische Analyse der Lokalisation des defekten BEST1 Proteins innerhalb der Zelle dar. Während der Wildtyp (hiPSC_RPE_wt_1) ein streng basolateral an der Plasmamembran lokalisiertes BEST1 aufwies, war dieses bei beiden BD Patienten (hiPSC_RPE_+/Q238R und hiPSC_RPE_+/A243V) sowohl an der Plasmamembran als auch diffus innerhalb des Zytoplasmas der RPE-Zellen zu finden und schien bei hiPSC_RPE_+/Q238R zudem stark vermindert exprimiert zu werden (**Abb. 30**).

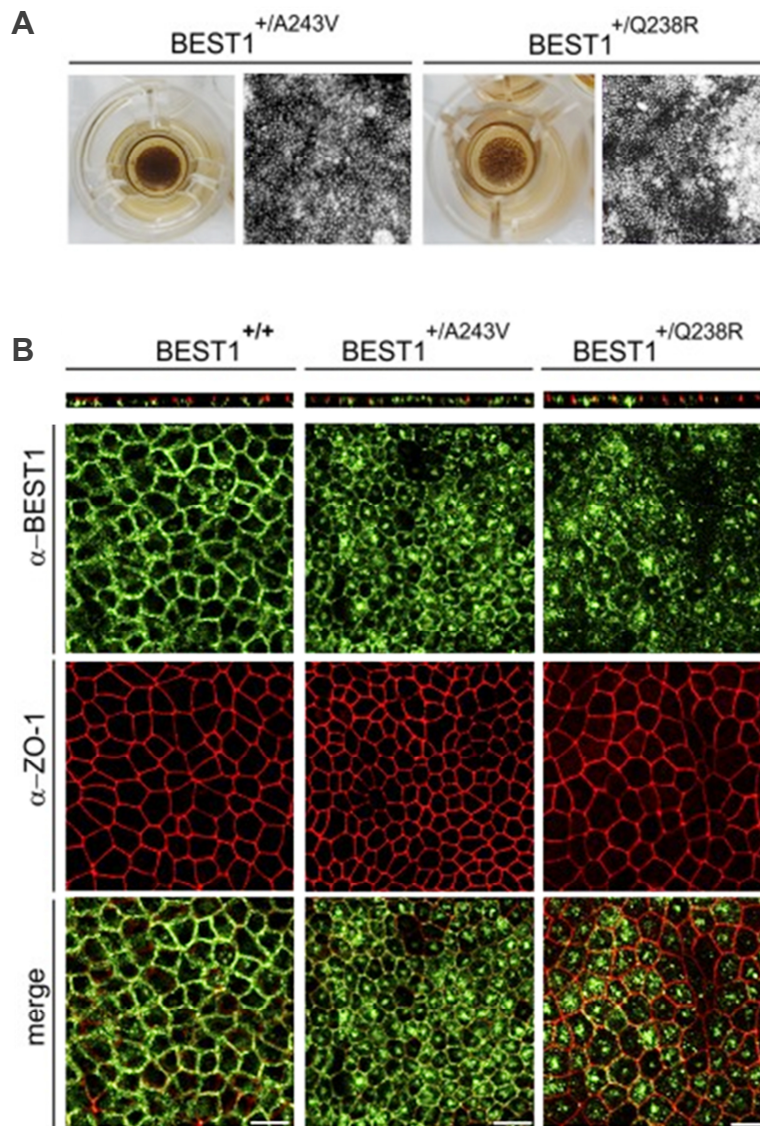


Abb. 30: Analyse der mutanten hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien.

A: Links: Fotografien von hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen zweier BD Patienten (hiPSC_RPE_+/A243V und hiPSC_RPE_+/Q238R) nach zweimonatigem Wachstum auf 12-Well-Transwellfiltern. Rechts:

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen dieser pigmentierten Zellrasen.

B: Proteinexpressionsprofil von Wildtyp (+/+) und mutanten hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien mit Antikörpern gegen den RPE-spezifischen Marker BEST1 (grün) und ZO-1 (rot). Gezeigt sind konfokale x-y und x-z Projektionen von polarem hiPSC-abgeleitetem RPE, das zwei Monate lang auf Transwellfiltern kultiviert worden war. Während ZO-1 bei jeder Zelllinie eine apikale Lokalisation aufwies, konnte BEST1 nur bei Wildtyp 1 (hiPSC_RPE_wt_1) streng der basolateralen Plasmamembran zugeordnet werden.

Bei beiden BD Patienten (hiPSC_RPE_+/Q238R und hiPSC_RPE_+/A243V) wurde BEST1 sowohl an der Plasmamembran als auch innerhalb des Zytoplasmas detektiert und lieferte bei hiPSC_RPE_+/Q238R zudem ein wesentlich schwächeres Signal. Maßstabsbalken je 20 μm . BEST1^{+/+} \triangleq hiPSC_RPE_wt_1; BEST1^{+/A243V} \triangleq hiPSC_RPE_+/A243V; BEST1^{+/Q238R} \triangleq hiPSC_RPE_+/Q238R. Bereits veröffentlicht in Milenkovic, Brandl et al. (2015) [4].

6. Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits in Brandl, Zimmermann et al. (2014) [5] und Milenkovic, Brandl et al. (2015) [4] diskutiert und veröffentlicht.

Mittels polyzystronischem Lentivirus und der Überexpression der vier Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *L-Myc* konnten dermale Fibroblasten erfolgreich zu humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) reprogrammiert werden.

Diese wuchsen in dicht bepackten, scharf begrenzten, rundlichen Kolonien [65] und zeigten eine typische Zellmorphologie mit prominenten Kernkörperchen (Nucleoli) sowie einer hohen Kern-Zytoplasma-Relation, die denen humaner embryonaler Stammzellen (hESC) glich.

Karyotypisierungen konnten numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen ausschließen. Vor allem in frühen Passagen ist dies äußerst wichtig [72], da chromosomale Veränderungen sowohl Differenzierungskapazität als auch Versuchsergebnisse beeinflussen können. Es wurde beschrieben, dass sich solche Aberrationen mit der Zeit, welche die Zellen in Kultur verbringen, und der Zahl der Passagen häufen [72]. Während wir chromosomale Veränderungen erst ab Passage 20 feststellen konnten, waren diese von anderen Arbeitsgruppen bereits wesentlich früher beobachtet worden [72]. Daher wurden die Differenzierungsansätze stets vor Passage 10 eingeleitet und vorher jeweils die chromosomale Integrität der entsprechenden hiPSC-Linien überprüft.

Alle generierten hiPSC-Linien zeigten stammzellspezifische RNA- und Proteinexpressionsprofile.

Mittels RT-PCR konnte auf RNA-Ebene in allen Stammzelllinien ein Rückgang des Bindegewebsmarkers *COL1A1* festgestellt werden, während die untersuchten Stammzellmarker bis auf *OCT4* ausschließlich in hiPSCs exprimiert wurden. Dass der Bindegewebsmarker *COL1A1* teilweise auch in RNA aus hiPSC-Kulturen zu finden war, stellte ein bereits bekanntes Phänomen dar [64, 65]. Es war in erster Linie auf das Auftreten vereinzelter Fibroblasten durch Redifferenzierung zurückzuführen. Daher war es äußerst wichtig, hiPSC-Kulturen vor jedem Splitten genau auf differenzierte Stellen hin zu untersuchen und diese aus der Zellkultur zu entfernen. Die schwach vorhandene *OCT4* Expression, die in den Fibroblastenlinien beobachtet werden konnte, stellte dagegen ein überraschendes und in der

Literatur bislang nicht beschriebenes Phänomen dar, das zukünftig näher beleuchtet werden sollte.

Auch auf Proteinebene ließen sich Stammzeleigenschaften durch Immunocytofärbungen der klassischen Stammzellmarker bei allen fünf hiPS-Zellreihen (hiPSC_wt_1, hiPSC_wt_2, hiPSC_+/Q238R, hiPSC_+/A243V und hiPSC_+/I295del) nachweisen.

Ebenso konnte die Pluripotenz der generierten hiPSCs Linien mittels Real-Time PCR und vorgegebenem Referenzpanel bestätigt werden, das als Richtwerte DNA-Methylierungskarteien und Genexpressionsprofile von 20 gut evaluierten embryonalen Stammzellen sowie 12 hiPSCs enthielt [73].

Mithilfe von Sequenzanalysen wurden die Mutationen in den drei Patientenlinien hiPSC_+/Q238R, hiPSC_+/A243V und hiPSC_+/I295del nochmals überprüft. So konnte gezeigt werden, dass die Mutationen beim Kultivieren und Reprogrammieren der Zelllinien aufgrund von Selektionsvorgängen, beispielsweise während der Transduktion, nicht verloren gegangen waren. Dieser Nachweis war entscheidend, da Linien von Patienten und Kontrollpersonen in nachfolgenden Versuchen vergleichend gegenübergestellt werden sollten.

Insgesamt konnte so ein Reprogrammierungsprotokoll mit optimalen Bedingungen für die zuverlässige Generierung von hiPSCs aus dermalen Fibroblasten etabliert werden. Für die nachfolgenden Differenzierungsansätze zu RPE standen schließlich zwei Kontrollzelllinien (hiPSC_wt_1, hiPSC_wt_2) und drei Patientenzelllinien (hiPSC_+/Q238R, hiPSC_+/A243V, hiPSC_+/I295del) mit unterschiedlichen Mutationen im *BEST1* Gen zur Verfügung.

Derzeit existiert bereits eine Reihe verschiedener Differenzierungsansätze von Stammzellen hin zu daraus abgeleitetem RPE, sodass ein geeignetes Protokoll sorgfältig ausgewählt werden musste [56, 66, 69, 74, 75].

Zunächst wurde nach dem Protokoll von Zhu, Carido et. al. (2013) [69] gearbeitet. Über die Generierung dreidimensionaler neuroepithelialer Zysten sollten hiPSCs in RPE differenziert werden. Auf diese Weise sollte die embryonale Entwicklung von humanem RPE aus neuroektodermalen Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) imitiert werden. Diese Vorläuferzellen gehen *in vivo* aus dem so genannten Neuralrohr hervor, das in diesem Protokoll *in vitro* durch einlumige neuroepitheliale Zysten nachgeahmt werden sollte [69].

Allerdings zeigten sich schon bei der Generierung der neuroepithelialen Zysten teilweise deutliche Unterschiede in Größe, Morphologie und Anzahl der erzeugten Zysten. Dies ließ sich auch in wiederholten Versuchen unter standardisierten Bedingungen nicht verbessern. Durch eine äußerst geringe Zellausbeute war es zudem sehr schwierig, aussagekräftige biologische Triplikate zu erhalten, da es im Folgenden nicht mehr möglich war, die differenzierten RPE-Zellen („ZRPE“) zu passagieren. Wie im Protokoll beschrieben, wurde dem RPE-Medium zur gerichteten Differenzierung Aktivin A (100 ng/ml) zugefügt. Dabei handelt es sich um ein Mitglied der TGF- β Familie, das eine entscheidende Rolle bei Zellproliferation und Differenzierung spielt und zudem das Überleben neuronaler Zellen sichert. Dennoch dauerte es in unseren Differenzierungsansätzen im Gegensatz zu den im Protokoll beschriebenen 18 Tagen schließlich mehr als 40 Tage, ehe sich die ersten Erfolge einstellten und einige Zellen der Linie hiPSC_wt_1 zu pigmentieren begannen. Dementsprechend konnte die vereinzelte Ausbildung eines RPE-typischen, hexagonalen Zellverbandes nicht ab Tag 25, sondern erst nach mehr als 50 Tagen in Zellkultur beobachtet werden. Trotz wiederholter Versuche mit unterschiedlich dicht ausgesäten Zellen bildete sich nur bei einer der fünf hiPS-Zelllinien (hiPSC_wt_1) tiefschwarzes, hexagonales RPE (hiPSC_ZRPE_wt_1_c1 und hiPSC_ZRPE_wt_1_c2). Dieses bedeckte makroskopisch die gesamte Filtermembran.

Funktionelle Analysen dieser pigmentierten Zellen konzentrierten sich zunächst auf die Expression des BEST1 Proteins, das als Transmembranprotein vor allem an der basolateralen Plasmamembranseite des RPE zu finden ist [50-52, 76]. Erstaunlicherweise war das BEST1 Protein, dessen Expression unter *in vitro* Kultivierung sonst sehr empfindlich reagiert und nach einem Zeitraum von 5 – 6 Tagen in Zellkultur meist nicht mehr nachgewiesen werden kann [5], auch nach dreimonatiger Kultivierung dieser hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen („ZRPE“) auf Transwellfiltern vorhanden. Es zeigte eine korrekte Lokalisation an der basolateralen Plasmamembran, was mit Hilfe der zusätzlichen Fluoreszenzmarkierung des an der apikalen Plasmamembran befindlichen tight junction markers ZO-1 [77] überprüft werden konnte.

Als Bestandteil der Blut-Retina-Schranke ist es für das RPE zudem äußerst wichtig einen funktionsfähigen apikalen Verbindungskomplexes aus tight-, adherens- und gap junctions zu bilden. Im Sinne einer physikalischen Barriere zwischen Choroidea und subretinalem Raum kann es so intermembranöse Diffusionen verhindern [6]. Hierdurch kann es sowohl Zellpolarität als auch transepitheliale Widerstände (TER) aufrechterhalten. Obwohl sich der

tight junction marker ZO-1 bei hiPSC_ZRPE_wt_1_c1 und hiPSC_ZRPE_wt_1_c2 als ununterbrochene Linie am apikalen Rand der einzelnen Zellkörper abzeichnete, konnten wir keinen Anstieg der transepithelialen Widerstände feststellen. Wir führten das Phänomen in erster Linie auf die mehrmonatige Differenzierungsdauer zurück. Während dieser Zeit konnte ein teils vollständiges Ablösen einiger Zellen von den beschichteten Transwellfiltern selbst durch sehr vorsichtiges Pipettieren nicht immer verhindert werden. Zudem hatten sich innerhalb des Zellrasens über die Zeit zum Teil mikroskopisch sichtbare Lücken gebildet, die durch interzelluläre Flüssigkeits- und Ionenströme die Ausbildung der transepithelialen Widerstände verhinderten.

Aus Mangel an Zellmaterial konnten keine weiteren funktionellen Charakterisierungen, wie die Erstellung eines RNA-Expressionsprofils oder POS-Fütterungsexperimente vorgenommen werden. Wegen der geringen Reproduzierbarkeit und Zellausbeute erwies sich dieses Protokoll hier insgesamt als eher ungeeignet, weshalb die Stammzellen noch nach einem weiteren Protokoll differenziert wurden.

Dieses leicht abgewandelte Protokoll nach Krohne, Westenskow et al. (2012) [66] stellte sich in den hier durchgeführten Differenzierungsansätzen dagegen als höchst effizient heraus und lieferte bei vier der fünf Zelllinien zuverlässig gleichbleibende Ergebnisse. Durch Umstellung des Mediums und Zugabe von Aktivin A (62 ng/ml) konnte eine Umwandlung von hiPSCs zu hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen beobachtet werden. Innerhalb von 8 Wochen zeigten sich bei allen Differenzierungsansätzen auf jedem Well der verwendeten 6-Well Platten zwischen den konfluenten hiPSCs Kolonien etwa 25 – 40 unregelmäßige und unterschiedlich große, pigmentierte Zellareale. Unter dem Lichtmikroskop zeigten sich in diesen Regionen bereits hexagonale Zellen, die mechanisch exzidiert und aufgezinkt werden konnten. Sie lieferten meist schon nach einer einzigen Passage reines, einschichtiges RPE, das sich als dichter Rasen über die gesamte Zellkulturschale erstreckte. Dass es hierbei nicht in allen Fällen zur erneuten Pigmentierung kam, war bereits von humanem RPE aus Spendernetzhäuten bekannt.

Nur bei einer der fünf Zellreihen, hiPSC_RPE_+/I295del, gelang es nicht reines RPE zu erzeugen. Da die typisch hexagonale Morphologie dieser pigmentierten Zellen allerdings einzigartig ist und als solche bereits einen eindeutigen Parameter für die Identifizierung von unversehrtem RPE darstellt, wurde diese Zelllinie von den weiteren Versuchen ausgenommen.

Da undifferenzierte Stammzellen in Empfängergeweben Teratome ausbilden können [78, 79] wurde das hiPSC-abgeleiteten RPE äußerst genau nach unregelmäßigen Zellarealen abge-

sucht. Bereits nach der ersten Passage zeigten sich nur noch äußerst selten andersförmige Zellen, die am ehesten an Fibroblasten erinnerten. Nach wenigen Passagen verschwanden diese jedoch von selbst wieder aus der Zellkultur, ohne dass sie mechanisch entfernt werden mussten. Indem die Oberflächenbeschichtung von hESC-qualified Matrigel auf growth factor reduced (gfr)-Matrigel in ähnlicher Verdünnung umstellt wurde, konnten eine Kontamination mit RPE fremden Zellen deutlich verringert und zudem ein besseres Zellwachstum erreicht werden.

Außerdem wurden die Unterschiede zwischen hiPSC-abgeleitetem RPE, das unpolar in Zellkulturschalen wuchs, und solchem, das polar auf Transwellfiltern kultiviert wurde, beleuchtet. Innerhalb eines unpolar auf 6-Well Platten kultivierten hiPSC-abgeleiteten RPE-Rasens zeigten sich schon nach etwa 6 Wochen durch Zelluntergang entstandene Lücken. Dagegen konnten hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen auf Transwellfiltern mehrere Monate lang kultiviert werden, ehe sich die ersten Anzeichen von Apoptose bemerkbar machten. Auch auf Proteinebene konnte man eindeutige Unterschiede erkennen. Während das BEST1 bei hiPSC-abgeleitetem RPE, das auf beschichteten Transwellfiltern wuchs, korrekt an der basolateralen Plasmamembran lokalisiert war, konnte es bei hiPSC-abgeleitetem RPE, das unpolar auf Glasplättchen mit derselben Beschichtung kultiviert wurde, zusätzlich diffus im Zytoplasma der Zellen detektiert werden. Dies ließ auf eine gestörte Funktion der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen mit einem ungenügenden Transport des BEST1 Proteins ausgehend vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi Apparat bis hin zu seinem Einbau in die Plasmamembran schließen [50]. Insgesamt bestätigte dies erneut die Notwendigkeit polarisierter Filtersysteme zur Kultivierung von RPE, die dessen natürliches Wachstum *in vitro* deutlich besser imitierten [10, 66].

Da es darüber hinaus möglich war, hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen enzymatisch von den Filtermembranen zu lösen und zu passagieren, wurden für die nachfolgenden Experimente 3D-Kulturen mit polarem Zellwachstum präferiert.

Einen weiteren Punkt bei der Etablierung neuer Zellkulturmodelle stellt die Festlegung der maximalen Passagekapazität dar, welche innerhalb der unterschiedlichen Kultursysteme in verschiedenen Laboratorien zum Teil stark variiert. Es wurde bereits gezeigt, dass hiPSC-abgeleitetes RPE, bei dem es sich normalerweise um postmitotisches Gewebe handelt, *in vitro* mehrfach passagiert werden kann, ehe es dem natürlichen Alterungsprozess zum Opfer fällt [67]. Im Gegensatz zu den ab Passage 3 beschriebenen Veränderungen [67], entwickelten sich

bei den hier generierten hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien allerdings erst ab Passage 6 Zeichen der Seneszenz. Diese äußerten sich in einer unregelmäßigen Zellmorphologie, einer veränderten Expression des BEST1 Proteins und einem Rückgang der transepithelialen Widerstände. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente an hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen stets vor Passage 4 durchgeführt.

RNA-Expressionsprofile zeigten bei allen vier hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien einen semiquantitativen Anstieg retinaler Marker, der mit dem humaner RPE Zellen vergleichbar war. Wie erwartet kam es zusätzlich zu einem Rückgang des Stammzellmarkers *NANOG*, der in den zu Grunde liegenden hiPSC-Linien noch stark exprimiert wurde.

Zudem bestätigte ein Anstieg der Transepithelialen Widerstände die Ausbildung funktioneller Tight Junctions bei allen vier Zelllinien (hiPSC_RPE_wt_1, hiPSC_RPE_wt_2, hiPSC_RPE_+/Q238R und hiPSC_RPE_+/A243V).

Am Beispiel der Zelllinie wt_1 wurde eine vollständige und ausführliche Charakterisierung der generierten hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen etabliert.

Expressionsprofile mit Antikörpern gegen das retinale BEST1 und den Tight Junction Marker ZO-1 bestätigten retinale Eigenschaften des hiPSC-abgeleiteten RPE auf Proteinebene. Bei wiederholten Aufnahmen lieferte jede einzelne Zelle ein positives Signal für diese beiden Marker, was auf eine zu 100 % reine hiPSC-abgeleitete RPE-Zellkultur zurückzuführen war. Auch hier konnte bei hiPSC-abgeleitetem RPE, das sich bereits mehr als 2 Monate in Zellkultur befand und mehrfach passagiert worden war, eine gleichbleibend hohe Expression des BEST1 Proteins beobachtet werden. Dieses zeigte bei hiPSC_RPE_wt_1 eine Lokalisation an der basolateralen Seite der Plasmamembran, was in nach dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mittels Biotinylierung bestätigt wurde [5]. Bei weniger als 2 Monate lang kultiviertem hiPSC-abgeleitetem RPE befand sich das BEST1 Protein dagegen noch weitgehend im Zytoplasma der Zellen, was darauf hindeutete, dass hiPSC-abgeleitetes RPE mehrere Wochen brauchte, um zu funktionsfähigem Gewebe heranzureifen [5]. Erst nach etwa 6 Passagen konnte als Zeichen der Seneszenz erneut eine diffuse zytoplasmatische Anreicherung des BEST-1 Proteins innerhalb der Zellen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente nur an hiPSC-abgeleitetem RPE durchgeführt, das sich bereits mindestens 2 Monate lang in Zellkultur befand und nicht öfter als vier Mal passagiert worden war.

Zur Ernährung, Phagozytose von POS und Regeneration des Sehfärbstoffs Rhodopsin [6, 73] besitzt humanes RPE *in vivo* im Sinne der Oberflächenvergrößerung an seiner apikalen Membran lange schlanke Fortsätze (Mikrovilli), die sich fingerförmig zwischen die Stäbchen und Zapfen der Photorezeptorschicht stülpen. Auch das Vorhandensein basaler Mikrovilli, die das RPE auf Seiten der Choriokapillaris ausbildet, wurde *in vivo* bereits beschrieben [80]. Um diese morphologischen Aspekte auch bei hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen *in vitro* untersuchen zu können, analysierten wir die generierten Zellen zusätzlich auf ultrastruktureller Ebene sowohl im low vac als auch im high vac modus mittels Rasterelektronenmikroskopie.

Die Aufnahmen der Zellen in noch feuchtem Zustand (low vac modus) eigneten sich sehr gut, um die regelmäßige, hexagonale Struktur des hiPSC-abgeleiteten RPE darzustellen. Sie eigneten sich jedoch nicht zur Beurteilung der apikalen Mikrovilli, da diese durch den vorhandenen Flüssigkeitsfilm auf die Zelloberfläche gedrückt wurden, was ihre detaillierte Darstellung verhinderte.

Die Fotografien in getrocknetem Zustand (high vac Modus) lieferten dagegen sehr detailreiche Oberflächenaufnahmen. Man erkannte apikale Mikrovilli, die sich in Form von ca. 0,1 µm dicken und etwa 2 µm langen, fadenförmigen Fortsätzen über die gesamte Zellkultur erstreckten. Allerdings verhinderten die Mikrovilli teilweise eine gute Abgrenzung der einzelnen Zellkörper, da sie sich wie ein geschlossener Rasen über den gesamten Zellverband erstreckten. Darüber hinaus ergaben sich durch den Schritt der Kritisch-Punkt-Trocknung vereinzelt Trocknungsartefakte, die zu einer Spaltbildung zwischen den einzelnen Zellkörpern führten.

Auf Grund der Filtermembranen, die zur Stabilisierung der Gewebsverbände bei der Präparation nicht von den RPE Zellen gelöst werden konnten, war eine Beurteilung der basalen Mikrovilli nicht möglich. Insgesamt stellte jedoch auch das Ergebnis der Rasterelektronenmikroskopie einen Anhalt für die Funktionsfähigkeit der generierten hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen dar.

Darüber hinaus wurden Fütterungsexperimente mit fluoreszenzmarkierten POS (Oregon green 488) etabliert, was eine weitere, funktionelle Charakterisierung ermöglichte. So könnten in späteren Experimenten beispielsweise durch einen direkten Vergleich von Aufnahmefähigkeit und Abbauleistung Rückschlüsse auf vorliegende Pathomechanismen mutanter Zelllinien gezogen werden.

Mittels Immunofluoreszenz und konfokaler Mikroskopie konnte bestätigt werden, dass das hier erzeugte hiPSC-abgeleitete RPE in der Lage war, POS aufzunehmen und zu metabolisieren. Die Lage der POS außerhalb und innerhalb der hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen konnte durch Schichtaufnahmen (z-stacks) und gleichzeitige Immunzytofärbung des Tight Junction Markers ZO-1 ermittelt werden. Auf Grund ihrer bekannten Autofluoreszenz [81] waren die mit Oregon green 488 gelabelten POS nicht nur im grünen Kanal zu sehen, sondern lieferten auch im roten Kanal ein deutliches Signal. Für statistische Auswertungen fertigten wir allerdings nur Bilder im grünen Kanal, bei denen wir einen signifikanten Anstieg der Phagozytosekapazität in Fütterungsexperimenten mit 20 POS/Zelle [56] innerhalb der ersten 6 h feststellen konnten. Dieser Anstieg blieb auch zwischen 6 h und 24 h bestehen, war hier jedoch deutlich schwächer und statistisch nicht mehr signifikant. Als Ursache vermuteten wir in erster Linie einen nach etwa 6 h einsetzenden Sättigungseffekt. Unsere Berechnungen zeigten, dass nach 24 h 10 % der zugegebenen POS in die Zellen aufgenommen waren und jede hiPSC-abgeleitete RPE-Zelle im Schnitt 2 POS phagozytiert hatte. Im Gegensatz zu Aufnahmen nach 6 h waren die POS (Stäbchen: $0,8 - 4,9 \mu\text{m}^2$; Zäpfchen: $1,1 - 9,6 \mu\text{m}^2$; [82]) nach 24 h nicht mehr rund und kugelig, sondern asymmetrisch, degradiert und teilweise bereits von den RPE Zellen verdaut worden.

Alle beschriebenen Protokolle waren zeit- und arbeitsintensiv, wodurch in dieser Arbeit maximal 3 bis 5 verschiedene hiPSC-Linien zu einem gegebenen Zeitpunkt zu RPE differenziert werden konnten. Um in folgenden Experimenten noch mehr hiPSC-abgeleitete RPE-Zelllinien miteinander vergleichen zu können, war es äußerst wichtig, auch das Kryokonservieren von krankheits- und patientenspezifischen hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen zu etablieren. Diese mussten postcryo nicht nur überlebensfähig sein, sondern darüber hinaus charakteristische RPE-Merkmale, wie typische RNA- und Proteinexpressionsprofile, beibehalten. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich nach etwa vier Wochen wieder ein geschlossener Rasen hexagonaler Zellen gebildet hatte und BEST-1 auf Proteinebene weiterhin nachweisbar war. Es war jedoch nicht mehr so strikt nur an der basolateralen Plasmamembran lokalisiert, wie noch vor dem Einfrieren der Zellen. Auch die transepithelialen Widerstände stiegen postcryo an. Es dauerte allerdings etwa 3 bis 6 Wochen länger, ehe ähnlich hohe Werte erreicht waren wie bei frisch differenzierten hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen [5].

Darüber hinaus konnte in nach dieser Arbeit durchgeführten Experimenten an dem hier generierten hiPSC-abgeleiteten RPE gezeigt werden, dass die POS-Phagozytosekapazität auch

postcryo uneingeschränkt blieb. Dagegen war die Sekretion von VEGF-A, einem weiteren wichtigen Parameter für die Analyse von funktionsfähigem RPE, nach dem Einfrieren der Zellen zurückgegangen [5].

In der Zusammenschau zeigte sich also, frisches, noch in seiner ursprünglichen Kultur befindliches, hiPSC-abgeleitetes RPE als Forschungsgrundlage zu verwenden. Da hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen aber auch postcryo weitgehend unveränderte strukturelle wie funktionelle Eigenschaften beibehalten, scheint es durchaus möglich, in Zukunft kryokonservierte Zellen als verlässliche Quelle für groß angelegte Vergleichsstudien heranzuziehen.

Insgesamt dauerte es etwa einen Monat, um aus Hautstanzen Fibroblasten zu erzeugen, woran sich etwa 7 weitere Monate für deren Reprogrammierung zu hiPSCs und die anschließende Differenzierung in reife hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen anschlossen. Erst dann konnte mit den eigentlichen Versuchen an den differenzierten Zellen begonnen werden, die je nach Versuch zusätzlich einige Wochen in Anspruch nahmen. Da das Protokoll zudem sehr arbeitsintensiv war und für die Experimente pro Klon stets mehrere 6-Well Platten mit entsprechend aufwändiger Zellkultur gleichzeitig bearbeitet werden mussten, war es nicht möglich, alle Zelllinien parallel zu bearbeiten.

Daher konnten im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit wildtypische und mutante hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen nur initial bezüglich ihrer Unterschiede im BEST1-Proteinexpressionsprofil vergleichend gegenüber gestellt werden. Während wt_1 und wt_2 ein korrekt an der basolateralen Plasmamembran lokalisiertes BEST1 Protein aufwiesen, zeigten die hier generierten mutanten Zelllinien eine deutlich veränderte Proteinexpression. Sowohl bei hiPSC_RPE_+/Q238R (AVMD) als auch bei hiPSC_RPE_+/A243V (BVMD) konnte das BEST1 Protein gleichzeitig an der Plasmamembran als auch diffus im Zytoplasma der Zellen detektiert werden. Zudem lieferte BEST1 bei hiPSC_RPE_+/Q238R eine stark reduzierte Signalintensität. Da beide BD Patienten heterozygot bezüglich ihrer Mutation waren, unterstrich dieses Ergebnis zudem den dominant negativen Effekt eines veränderten *BEST1* Gens gegenüber dem wildtypischen *BEST1*.

Ein fehlerhafter Einbau des BEST1 Proteins wurde schon mehrfach mit der Entstehung von Erkrankungen aus dem Formenkreis der Bestrophinopathien, zu denen die hier beschriebenen mutanen Zelllinien zählen, in Verbindung gebracht [3, 33]. Es existieren jedoch auch Studien, die zeigen konnten, dass das BEST1 Protein trotz Überexpression einer BVMD verursachenden Mutation (beispielsweise Best1^{W93C} in fötalem humanem RPE) mitunter eine

korrekte Lokalisation an der basolateralen Plasmamembranseite beibehält [83, 84]. Die hier gewonnenen Erkenntnisse erhärten somit die Vermutung, dass es bei BVMD und AVMD, ähnlich wie bei ARB, sowohl zu einem korrekten, als auch zu einem fehlerhaften Einbau des BEST1 Proteins kommen kann [3, 33]. Insgesamt kann ein fehlerhafter Einbau daher nicht allein als Ursache für die unterschiedlichen Erkrankungen gesehen werden und wird darüber hinaus zum Teil gut toleriert [33]. Wie in den meisten Untersuchungen bezog sich auch hier die Fragestellung lediglich darauf, ob mutantes BEST1 Protein in der Plasmamembran oder dem Zytoplasma der Zellen zu finden ist. Es wurde nicht geklärt, in welchen Zellkompartimenten das fehlerhafte BEST1 jeweils zurückgehalten wird und ob sich hierdurch beispielsweise mutationsspezifische Unterschiede in Abbauvorgängen oder anderen Stoffwechselwegen ergeben [33]. Da ein genaueres Verständnis der molekularen Pathogenese dazu beitragen könnte, die krankheits- und patientenspezifischen Unterschiede zu verstehen, sollten auch diese Aspekte in Zukunft näher beleuchtet werden.

Andere Experimente an den mutanten hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien, wie beispielsweise Langzeit-Fütterungsexperimente mit POS oder ultrastrukturelle REM-Aufnahmen, standen bei Abschluss dieser Arbeit im Rahmen der vorgegebenen Zeit noch aus. Auch hier wäre es allerdings äußerst interessant, wildtypische und mutante Zelllinien vergleichend gegenüber zu stellen.

In nachfolgend durchgeführten Experimenten gelang es Milenkovic, Brandl et al. (2015) [4] unter anderem auf Basis der in dieser Arbeit erzeugten Zelllinien (hiPSC_RPE_wt_1, hiPSC_RPE_+/Q238R, hiPSC_RPE_+/A243V) einen neuen Aspekt der *BEST1* Funktion zu entschlüsseln.

In RNA-Expressionsprofilen konnten sie zunächst zeigen, dass die hier erzeugten hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien bekannte Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ionenkanäle (*CaCCs*), die kürzlich entdeckten „leucine-rich repeats containing 8A“ (*LRRC8A*) und Mitglieder der *BEST* Familie in ähnlicher Weise exprimieren, wie natives humanes RPE [4]. Sie erbrachten den Nachweis, dass *BEST1* und nicht, wie zunächst vermutet, *LRRC8A* [85] entscheidend an der Volumenregulation humaner RPE-Zellen beteiligt ist. Mittels funktioneller Patch-Clamping Experimente konnte gezeigt werden, dass hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen auswärtsgerichtete Cl^- -Ionenströme aufweisen, die auf die Anwesenheit von VRACs zurückzuführen sind. Diese Ströme waren in beiden hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien, die durch Mutationen im *BEST1* Gen eine veränderte Expression des BEST1 Proteins aufwiesen, stark erniedrigt. Veränderte

man dagegen die *LRRC8A* Expression in den hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen mittels lentiviraler Transduktion, war kein entsprechender Rückgang festzustellen. Das legte die Schlussfolgerung nahe, dass das Protein BEST1 als volumenregulierter Chloridkanal einen wichtigen Bestandteil von VRACs darstellt. Insgesamt folgerten Milenkovic, Brandl et al. (2015) [4], dass es sich bei VRACs nicht um singuläre, ubiquitär exprimierte Ionenkanäle handelt, sondern dass diese aus verschiedenen Untereinheiten, wie BEST1, bestehen, die zell- und gewebsspezifisch unterschiedlich zusammengesetzt sein können. Das Aufdecken weiterer Untereinheiten und zellspezifischer Zusammensetzungen könnte so zu einem völlig neuen Verständnis über die zu Grunde liegenden Pathomechanismen *BEST1*-abhängiger Erkrankungen beitragen.

Doch nicht nur bei der Erforschung der molekularen Pathogenese, sondern auch im Bereich des *in vitro* Medikamentenscreenings, wird hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen derzeit ein großes Potential zugeschrieben [86]. In der Arzneimittelentwicklung könnten *in vitro* generierte RPE-Modelle humaner Zellen präklinische *in vivo* Tierversuche in den Hintergrund treten lassen oder teilweise sogar ganz ersetzen. Zudem würden sie die krankheits- und patientenspezifische Erforschung diverser Pharmaka ermöglichen und könnten so die Entwicklung neuer medikamentöser Behandlungsmöglichkeiten beschleunigen.

Außerdem könnte hiPSC-abgeleitetes RPE in naher Zukunft auch im Bereich der zellbasierten Transplantationstherapie Anwendung finden, ähnlich dem aus embryonalen Stammzellen gewonnenem RPE, das bereits heute die nötigen Standards für klinische Studien erfüllt [78]. Gerade bei den Bestrophinopathien oder der AMD, die sich oft erst im Verlauf vieler Jahrzehnte manifestieren, könnte zu Grunde gegangenes Gewebe durch patienteneigene „jüngere“ Zellen ersetzt werden. Diese könnten aus autologen Hautstanzen gewonnen und schließlich in RPE differenziert werden, das noch nicht einem mit dem Alter der Zellen zunehmenden Funktionsverlust zum Opfer gefallen ist [66]. Erfolgreiche Transplantationen mittels subretinaler Injektion an RCS-Ratten haben gezeigt, dass hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen *in vivo* ein Ausdünnen der murinen Retinae verhindern, ohne dass das Auftreten von Teratomen beobachtet wurde [66]. 2013 startete in Japan eine neue klinische Pilotstudie, bei welcher erkranktes RPE einer 70-jährigen Patientin mit feuchter AMD zunächst operativ entfernt und anschließend durch autologe *in vitro* gezüchtete hiPSC-abgeleitete RPE Transplantate (1,3 x 3 mm) ersetzt wurde. Ein Jahr nach Transplantation war der Visus, der sich zuvor trotz Ausschöpfung therapeutischer Optionen stetig verschlechter hatte, stabil und die Patientin gab subjektiv sogar eine Besserung ihres Sehvermögens im QOL („Quality of

Life“) Fragebogen an. Es war keine Immunsuppression nötig, die Makula der Patientin schien sich zu regenerieren. Auch nach zwei Jahren waren keine Zeichen für ein Krankheitsrezidiv mit vermehrter Gefäßeinsprossung erkennbar. Weder lokal noch systemisch ergaben sich bei der Patientin Hinweise auf Tumorgenität [„Pilot clinical study into iPS cell therapy for eye disease starts in Japan“; http://www.riken.jp/en/pr/press/2013/20130730_1/ (28.03.2016)]. Auch wenn die Transplantation von hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen noch keine weltweit durchführbare Therapieoption darstellt und mögliche Risiken, wie das Auftreten von Immunreaktionen, oder die Induktion von Teratomen in Langzeitstudien weiterhin genau untersucht werden müssen, scheinen die bisher erzielten Resultate durchaus vielversprechend. Darüber hinaus erhöhen die bereits etablierten, integrationsfreien Reprogrammierungsprotokolle, wie beispielsweise die non-invasive Gewinnung von hiPSC aus Keratinozyten menschlicher Haare, die Chance degenerative Erkrankungen irgendwann durch die Transplantation von hiPSC-abgeleiteten Geweben, wie hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen, therapieren zu können.

Auch die erfolgreiche Gentherapie mittels Adenovirus-assoziiierter Transduktion an hiPSCs wurde bereits beschrieben [86]. Es gelang Vasireddy, Mills et al. (2015) [87] bei Choroideremia, einer Erkrankung, die durch Degeneration von RPE und Choriokapillaris in der zweiten Lebensdekade zur Erblindung führt, das zugrunde gegangene *CHM* Gens wieder in hiPSC Zellen einzuschleusen und diese anschließend in funktionsfähiges hiPSC-abgeleitetes RPE zu differenzieren. Auf diese Weise konnte der krankheitsverursachende Verlust des REP-1 Proteins (Rab Escort Protein 1) *in vitro* rückgängig gemacht werden [87]. Hierdurch sind hiPSCs und hiPSC-abgeleitete RPE-Zellen inzwischen sogar in den Focus gentherapeutischer Behandlung gerückt.

Um Betroffenen genetisch bedingter Erkrankungen des RPE irgendwann kausale Behandlungsmöglichkeiten anbieten zu können, scheint es somit wichtig, die Grundlagenforschung im Bereich der hiPSCs und daraus abgeleiteten RPE Zellen in verschiedenen Laboratorien weiter voranzutreiben.

Zusammenfassend war es in dieser Studie gelungen, durch die ausführliche Charakterisierung der hier erzeugten Zelllinien ein zuverlässiges Differenzierungsprotokoll am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg zu etablieren. Aus Hautstanzen von zwei Kontrollpersonen und drei Patienten mit Mutationen im *BEST1* Gen waren vier vollständig reine hiPSC-abgeleitete RPE-Linien generiert worden. Dabei handelte es sich um zwei Kontroll-

linien (hiPSC_RPE_wt_1, hiPSC_RPE_wt_2) und zwei Patientenlinien (hiPSC_RPE_+/Q238R, hiPSC_RPE_+/A243V) mit unterschiedlichen Mutationen im *BEST1* Gen. Sie wiesen charakteristische RPE Merkmale auf, konnten mehrfach passagiert und sogar kryokonserviert werden. Im Gegensatz zu humanem RPE aus Spendernetzhäuten behielten sie *in vitro* lange Zeit eine gleichbleibend hohe BEST1 Expression bei, was für die folgenden Versuche, wie die Untersuchung von Mutationen im *BEST1* Gen auf Proteinebene, von großer Bedeutung war.

Darüber hinaus kann das hier etablierte Protokoll zukünftig auch für die Erforschung von *BEST1*-unabhängigen Erkrankungen des RPE herangezogen werden. Außerdem werden die in dieser Arbeit generierten Fibroblasten-, hiPSC- und hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien in Form kryokonservierter Zellbanken auch weiterhin für Versuche zur Verfügung stehen. Welche ergänzenden Schlüsse und Konsequenzen sich in Zukunft noch aus dem hier etablierten Versuchsmodell ziehen lassen, bleibt somit abzuwarten.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012 May 5;379(9827):1728-38.
- [2] Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014 Feb;2(2):e106-16.
- [3] Milenkovic VM, Rohrl E, Weber BH, Strauss O. Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance. *J Cell Sci*. 2011 Sep 1;124(Pt 17):2988-96.
- [4] Milenkovic A, Brandl C, Milenkovic VM, Jendryke T, Sirianant L, Wanitchakool P, et al. Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 19;112(20):E2630-9.
- [5] Brandl C, Zimmermann SJ, Milenkovic VM, Rosendahl SM, Grassmann F, Milenkovic A, et al. In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). *Neuromolecular Med*. 2014 Sep;16(3):551-64.
- [6] Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*. 2010 Dec;10(9):802-23.
- [7] Miller SS, Edelman JL. Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol*. 1990 May;424:283-300.
- [8] Marmor MF. Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol*. 1999;97(3-4):239-49.
- [9] Hamann S. Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol*. 2002;215:395-431.
- [10] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005 Jul;85(3):845-81.
- [11] Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*. 1993;17:189-95.
- [12] Tan J, Xu YP, Liu GP, Ye XH. Involvement of acid-sensing ion channel 1a in functions of cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2013 Feb;33(1):137-41.
- [13] Hollyfield JG, Rayborn ME, Midura RJ, Shadrach KG, Acharya S. Chondroitin sulfate proteoglycan core proteins in the interphotoreceptor matrix: a comparative study using biochemical and immunohistochemical analysis. *Exp Eye Res*. 1999 Sep;69(3):311-22.

- [14] Ban Y, Rizzolo LJ. Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000 May 11;121(1):89-95.
- [15] Baehr W, Wu SM, Bird AC, Palczewski K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res*. 2003 Dec;43(28):2957-8.
- [16] Strauss O, Stumpff F, Mergler S, Wienrich M, Wiederholt M. The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect. *Acta Anat (Basel)*. 1998;162(2-3):101-11.
- [17] Finnemann SC. Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *Embo J*. 2003 Aug 15;22(16):4143-54.
- [18] Flannery JG, Fisher SK. Circadian disc shedding in *Xenopus* retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984 Feb;25(2):229-32.
- [19] Nguyen-Legros J, Hicks D. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol*. 2000;196:245-313.
- [20] Pierce ME, Besharse JC. Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity. *Brain Res*. 1987 Mar 10;405(2):400-4.
- [21] Besharse JC, Hollyfield JG, Rayborn ME. Photoreceptor outer segments: accelerated membrane renewal in rods after exposure to light. *Science*. 1977 Apr 29;196(4289):536-8.
- [22] Besharse JC, Spratt G. Excitatory amino acids and rod photoreceptor disc shedding: analysis using specific agonists. *Exp Eye Res*. 1988 Oct;47(4):609-20.
- [23] Peters S, Lamah T, Kokkinou D, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U. Melanin protects choroidal blood vessels against light toxicity. *Z Naturforsch C*. 2006 May-Jun;61(5-6):427-33.
- [24] Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm*. 2003 Jun;11(2):91-105.
- [25] Bost LM, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM. Coexpression of FGF-5 and bFGF by the retinal pigment epithelium in vitro. *Exp Eye Res*. 1992 Nov;55(5):727-34.
- [26] Klettner A, Kaya L, Flach J, Lassen J, Treumer F, Roider J. Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growth factor in the RPE/choroid and primary RPE. *Mol Vis*. 2015;21:736-48.
- [27] Oczos J, Grimm C, Barthelmes D, Sutter F, Menghini M, Kloeckener-Gruissem B, et al. Regulatory regions of the paraoxonase 1 (PON1) gene are associated with

- neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Age (Dordr)*. 2013 Oct;35(5):1651-62.
- [28] Brandl C, Grassmann F, Riolfi J, Weber BH. Tapping Stem Cells to Target AMD: Challenges and Prospects. *J Clin Med*. 2015;4(2):282-303.
- [29] Marquardt A, Stöhr H, Passmore LA, Kramer F, Rivera A, Weber BH. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum Mol Genet*. 1998 Sep;7(9):1517-25.
- [30] Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T, et al. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):241-7.
- [31] Yardley J, Leroy BP, Hart-Holden N, Lafaut BA, Loeys B, Messiaen LM, et al. Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Oct;45(10):3683-9.
- [32] Burgess R, Millar ID, Leroy BP, Urquhart JE, Fearon IM, De Baere E, et al. Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *Am J Hum Genet*. 2008 Jan;82(1):19-31.
- [33] Johnson AA, Lee YS, Chadburn AJ, Tammamo P, Manson FD, Marmorstein LY, et al. Disease-causing mutations associated with four bestrophinopathies exhibit disparate effects on the localization, but not the oligomerization, of Bestrophin-1. *Exp Eye Res*. 2014 Apr;121:74-85.
- [34] Blodi CF, Stone EM. Best's vitelliform dystrophy. *Ophthalmic Paediatr Genet*. 1990 Mar;11(1):49-59.
- [35] Boon CJ, Klevering BJ, Leroy BP, Hoyng CB, Keunen JE, den Hollander AI. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res*. 2009 May;28(3):187-205.
- [36] Burgess DB, Olk RJ, Uniat LM. Macular disease resembling adult foveomacular vitelliform dystrophy in older adults. *Ophthalmology*. 1987 Apr;94(4):362-6.
- [37] Boon CJ, Theelen T, Hoefsloot EH, van Schooneveld MJ, Keunen JE, Cremers FP, et al. Clinical and molecular genetic analysis of best vitelliform macular dystrophy. *Retina*. 2009 Jun;29(6):835-47.
- [38] Deutman AF. Electro-oculography in families with vitelliform dystrophy of the fovea. Detection of the carrier state. *Arch Ophthalmol*. 1969 Mar;81(3):305-16.
- [39] Kaufman SJ, Goldberg MF, Orth DH, Fishman GA, Tessler H, Mizuno K. Autosomal dominant vitreoretinopathopathy. *Arch Ophthalmol*. 1982 Feb;100(2):272-8.

- [40] Vincent A, McAlister C, Vandenhoven C, Heon E. BEST1-related autosomal dominant vitreoretinopathopathy: a degenerative disease with a range of developmental ocular anomalies. *Eye (Lond)*. 2011 Jan;25(1):113-8.
- [41] Blair NP, Goldberg MF, Fishman GA, Salzano T. Autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC). *Br J Ophthalmol*. 1984 Jan;68(1):2-9.
- [42] Reddy MA, Francis PJ, Berry V, Bradshaw K, Patel RJ, Maher ER, et al. A clinical and molecular genetic study of a rare dominantly inherited syndrome (MRCS) comprising of microcornea, rod-cone dystrophy, cataract, and posterior staphyloma. *Br J Ophthalmol*. 2003 Feb;87(2):197-202.
- [43] Stöhr H, Milenkovic V, Weber BH. [VMD2 and its role in Best's disease and other retinopathies]. *Ophthalmologe*. 2005 Feb;102(2):116-21.
- [44] Boon CJ, van den Born LI, Visser L, Keunen JE, Bergen AA, Booij JC, et al. Autosomal recessive bestrophinopathy: differential diagnosis and treatment options. *Ophthalmology*. 2013 Apr;120(4):809-20.
- [45] Gerth C, Zawadzki RJ, Werner JS, Heon E. Detailed analysis of retinal function and morphology in a patient with autosomal recessive bestrophinopathy (ARB). *Doc Ophthalmol*. 2009 Jun;118(3):239-46.
- [46] Stone EM, Nichols BE, Streb LM, Kimura AE, Sheffield VC. Genetic linkage of vitelliform macular degeneration (Best's disease) to chromosome 11q13. *Nat Genet*. 1992 Jul;1(4):246-50.
- [47] Esumi N, Oshima Y, Li Y, Campochiaro PA, Zack DJ. Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation. *J Biol Chem*. 2004 Apr 30;279(18):19064-73.
- [48] Esumi N, Kachi S, Campochiaro PA, Zack DJ. VMD2 promoter requires two proximal E-box sites for its activity in vivo and is regulated by the MITF-TFE family. *J Biol Chem*. 2007 Jan 19;282(3):1838-50.
- [49] Esumi N, Kachi S, Hackler L, Jr., Masuda T, Yang Z, Campochiaro PA, et al. BEST1 expression in the retinal pigment epithelium is modulated by OTX family members. *Hum Mol Genet*. 2009 Jan 1;18(1):128-41.
- [50] Milenkovic VM, Rivera A, Horling F, Weber BH. Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1313-21.
- [51] Marmorstein AD, Marmorstein LY, Rayborn M, Wang X, Hollyfield JG, Petrukhin K. Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12758-63.

- [52] Tsunenari T, Sun H, Williams J, Cahill H, Smallwood P, Yau KW, et al. Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):41114-25.
- [53] Neussert R, Muller C, Milenkovic VM, Strauss O. The presence of bestrophin-1 modulates the Ca^{2+} recruitment from Ca^{2+} stores in the ER. *Pflugers Arch*. 2010 Jun;460(1):163-75.
- [54] Doumanov JA, Zeitz C, Dominguez Gimenez P, Audo I, Krishna A, Alfano G, et al. Disease-causing mutations in BEST1 gene are associated with altered sorting of bestrophin-1 protein. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):15121-40.
- [55] Kane Dickson V, Pedi L, Long S. Structure and insights into the function of a Ca^{2+} -activated Cl^{-} channel. *Nature*. 2014 Dec 11;516(7530):213-8.
- [56] Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, et al. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2013 Feb 1;22(3):593-607.
- [57] Sparrow JR, Zhou J, Ben-Shabat S, Vollmer H, Itagaki Y, Nakanishi K. Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Apr;43(4):1222-7.
- [58] Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):4008-13.
- [59] Hartzell HC, Qu Z, Yu K, Xiao Q, Chien LT. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol Rev*. 2008 Apr;88(2):639-72.
- [60] Rosenthal R, Strauss O. Ca^{2+} -channels in the RPE. *Adv Exp Med Biol*. 2002;514:225-35.
- [61] Rosenthal R, Heimann H, Agostini H, Martin G, Hansen LL, Strauss O. Ca^{2+} channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. *Mol Vis*. 2007;13:443-56.
- [62] Sontag E. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal*. 2001 Jan;13(1):7-16.
- [63] Burgess R, MacLaren RE, Davidson AE, Urquhart JE, Holder GE, Robson AG, et al. ADVIRC is caused by distinct mutations in BEST1 that alter pre-mRNA splicing. *J Med Genet*. 2009 Sep;46(9):620-5.
- [64] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.

- [65] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- [66] Krohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, Friedlander DF, Lehmann M, Dorsey AL, et al. Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Feb;1(2):96-109.
- [67] Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer J, Martin JM, Smith MA, et al. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Oct;54(10):6767-78.
- [68] Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, et al. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009 Oct;27(10):2427-34.
- [69] Zhu Y, Carido M, Meinhardt A, Kurth T, Karl MO, Ader M, et al. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS One*. 2013;8(1):e54552.
- [70] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- [71] Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*. 2004;11(7):pp. 36 - 42.
- [72] Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Oct 8;7(4):521-31.
- [73] Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, et al. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*. 2011 Feb 4;144(3):439-52.
- [74] Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med*. 2013 May;2(5):384-93.
- [75] Maruotti J, Wahlin K, Gorrell D, Bhutto I, Luty G, Zack DJ. A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2013 May;2(5):341-54.
- [76] Stöhr H, Marquardt A, Nanda I, Schmid M, Weber BH. Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. *Eur J Hum Genet*. 2002 Apr;10(4):281-4.

- [77] Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 1986 Sep;103(3):755-66.
- [78] Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet.* 2012 Feb 25;379(9817):713-20.
- [79] Kamada M, Mitsui Y, Matsuo T, Takahashi T. Reversible transformation and de-differentiation of human cells derived from induced pluripotent stem cell teratomas. *Hum Cell.* 2015 Jun 12.
- [80] Weber BH, Lin B, White K, Kohler K, Soboleva G, Herterich S, et al. A mouse model for Sorsby fundus dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Aug;43(8):2732-40.
- [81] Chang Y, Finnemann SC. Tetraspanin CD81 is required for the alpha v beta5-integrin-dependent particle-binding step of RPE phagocytosis. *J Cell Sci.* 2007 Sep 1;120(Pt 17):3053-63.
- [82] McHugh KJ, Tao SL, Saint-Geniez M. Porous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for retinal pigment epithelium transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Mar;55(3):1754-62.
- [83] Marmorstein AD, Kinnick TR, Stanton JB, Johnson AA, Lynch RM, Marmorstein LY. Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis.* 2015;21:347-59.
- [84] Johnson AA, Lee YS, Stanton JB, Yu K, Hartzell CH, Marmorstein LY, et al. Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. *Hum Mol Genet.* 2013 Dec 1;22(23):4688-97.
- [85] Voss FK, Ullrich F, Munch J, Lazarow K, Lutter D, Mah N, et al. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science.* 2014 May 9;344(6184):634-8.
- [86] Nguyen HV, Li Y, Tsang SH. Patient-Specific iPSC-Derived RPE for Modeling of Retinal Diseases. *J Clin Med.* 2015;4(4):567-78.
- [87] Vasireddy V, Mills JA, Gaddameedi R, Basner-Tschakarjan E, Kohnke M, Black AD, et al. Correction: AAV-Mediated Gene Therapy for Choroideremia: Preclinical Studies in Personalized Models. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129982.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 29: Auflistung der verwendeten Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung
μl	Mikroliter
ADVIRC	Autosomal dominate Vitreoretinchoroidopathie
ARB	Autosomal rezessive Bestrophinopathie
AS	Aminosäure
AVMD	Adulte vitelliforme Makuladystrophie
BD	Best Disease (Morbus Best)
BEST1	Bestrophin 1
Bp	Basenpaare
BVMD	Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (Morbus Best)
c	Klon
ca.	circa
CaCC	Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ionenkanäle
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidion-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm
Et al.	et alii (und andere)
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEK 293	Human embryonic kidney 293
hESC	Human embryonic stemcell (humane embryonale Stammzelle)
hiPSC	Human induced pluripotent stemcell (humane induzierte pluriponte Stammzelle)
H₂O	Wasser
ICC	Immunocytochemistry (Immunzytochemie)
IF	Immunofluorescence (Immunfluoreszenz)
K	Kalium
Kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
l	Liter
LRRC8A	leucine-rich repeats containing 8A

mA	Milliampere
MDCK II	Madin-Darby canine kidney
MEFs	mous embryonic feeder cells
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
M	Molar
MM	Mastermix
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of infection
ms	Millisekunden
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OCT	Optische Kohärenztomographie
p	Passage
P/S/G	Penicillin/Streptomycin/Glutamin
PB	Phosphate buffer (Phosphatpuffer)
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Saline)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
POS	Photoreceptor outer segments (Photorezeptoraußensegment)
qRT-PCR	Quantitative realtime PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
RCS	Royal College of Surgeons
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
TER	Transepithelialer Widerstand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
V	Volt
VRAC	Volumenregulierter Anionenkanal
wt	Wildtyp
ZO-1	Zonula occludens 1

8.2. Publikationen

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits wie folgt publiziert:

In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC).

Brandl C, **Zimmermann SJ**, Milenkovic VM, Rosendahl SM, Grassmann F, Milenkovic A, Hehr U, Federlin M, Wetzels CH, Helbig H, Weber BH. *Neuromolecular Med.* 2014 Sep; 16(3):551-64.

Hier wurde die in dieser Arbeit durchgeführte strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Zelllinie „wt1“ (= „WT1“) einer 26-jährigen gesunden Spenderin veröffentlicht. Hierzu gehörten Mutationsanalysen, die in dieser Publikation gezeigten RNA- und Proteinexpressionsprofile der hiPSC-Klone sowie RNA- und Proteinexpressionsprofile, Messungen der TER, REM Aufnahmen und POS-Phagozytose Experimente der daraus abgeleiteten RPE Zellen. Daneben wurde die hier beschriebene Etablierung eines zuverlässigen Differenzierungsprotokolls von hiPSCs hin zu hiPSC-abgeleitetem RPE am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg publiziert. Hierfür wurde das Protokoll nach Krohne, Westenskow et al. (2012) [66] mit leichter Modifikation gewählt. Die Etablierung beinhaltete die Festlegung geeigneter Kultivierungsbedingungen, wie maximaler Passagekapazitäten, die Wahl geeigneter Beschichtungen und Zellkultursysteme sowie das Kryokonservieren der hiPSCs und daraus abgeleitete RPE Zellen.

Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells.

Milenkovic A, Brandl C, Milenkovic VM, Jendryke T, Sirianant L, Wanitchakool P, **Zimmermann S**, Reiff CM, Horling F, Schrewe H, Schreiber R, Kunzelmann K, Wetzels CH, Weber BH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 May 19; 112(20):E2630-9.

Hier wurden die in der vorliegenden Arbeit erstellten Proteinexpressionsprofile der Zelllinien hiPSC_RPE_wt1 (= „BEST1^{+/+}“), hiPSC_RPE_+/Q238R (= „BEST^{+/Q238R}“) und hiPSC_RPE_+/A243V (= „BEST^{+/A243V}“) veröffentlicht.

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des menschlichen Auges	9
Abb. 2: Schematischer Überblick über die Funktionen des RPE	12
Abb. 3: Postulierte Membrantopologie von BEST1	16
Abb. 4: Zeitstrahl des Reprogrammierungsprotokolls	36
Abb. 5: Graphik zur zeitl. Einordnung der Reprogrammierungs- und Differenzierungsprotokolle	42
Abb. 6: Farbfundusfotos, Optische Kohärenztomographie (OCT) und Autofluoreszenz	57
Abb. 7: Hautstanzen und auswachsende Fibroblasten	58
Abb. 8: Transduktion	59
Abb. 9: Durchlichtmikroskopie (hiPSC_wt_1) bei Passage 9	59
Abb.10: Aufrechterhaltung einer reinen hiPS-Zellkultur	60
Abb.11: Sequenzanalyse	60
Abb.12: Karyogramme	61
Abb.13: RNA-Expressionsprofil der hiPSCs	62
Abb.14: Pluripotenzanalyse mittels qRT-PCR und TaqMan hPSC Scorecard Panel	63
Abb.15: Proteinexpressionsprofil der hiPSCs	64
Abb.16: Schema der Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop LSM510	66
Abb.17: In vitro-Differenzierung von hiPSC_wt_1 über neuroepitheliale Zysten	66
Abb.18: TER Zysten	67
Abb.19: Durchlichtmikroskopische Aufnahme aller hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien	68
Abb.20: Passagierung des hiPSC-abgeleiteten RPE, hier hiPSC_RPE_wt_1	69
Abb.21: RNA-Expressionsprofil aller hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien	70
Abb.22: Proteinexpressionsprofil von hiPSC_RPE_wt_1 auf Transwellfiltern und Glasplättchen	71
Abb.23: Rasterelektronenmikroskopie von hiPSC_RPE_wt_1	72
Abb.24: TER von hiPSC_RPE_wt_1 bei unterschiedlichen Passagen	73
Abb.25: POS-Phagozytose und Aufnahmekapazität von hiPSC_RPE_wt_1	74
Abb.26: Analyse der POS-Phagozytose von hiPSC_RPE_wt_1 mittels konfokaler Mikroskopie	74
Abb.27: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von hiPSC_RPE_wt_1 postcryo	75
Abb.28: Proteinexpressionsprofil von hiPSC_RPE_wt_1 postcryo	75
Abb.29: TER von hiPSC_RPE_wt_1 postcryo	76
Abb.30: Analyse der mutanten hiPSC-abgeleiteten RPE-Linien	77

8.4. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Zelllinien	20
Tab. 2: Enzyme	22
Tab. 3: Primär- und Sekundärantikörper	22
Tab. 4: Gen-spezifische Primer für RT-PCR	23
Tab. 5: Gen-spezifische Primer für qRT-PCR	24
Tab. 6: Gen-spezifische Primer für Sequenzanalysen	24
Tab. 7: Kit-Systeme	24
Tab. 8: Molekularmassenstandard	25
Tab. 9: Chemikalien	25
Tab.10: Medien, Puffer und Lösungen	27
Tab.11: Kulturmedien	29
Tab.12: Verbrauchsmaterial	32
Tab.13: Geräte	33
Tab.14: Software	34
Tab.15: Reaktionsschema der cDNA Synthese	43
Tab.16: Pipettierschema der GUS-PCR	44
Tab.17: Temperaturprofil der GUS-PCR	44
Tab.18: Pipettierschema einer PCR/RT-PCR mit der Go Taq-Polymerase	45
Tab.19: Temperatur für eine RT-PCR unter Standardbedingungen	45
Tab.20: MM für eine GXX-DMSO PCR (Genaxxon)	47
Tab.21: Temperaturprofil der GXX-DMSO PCR	48
Tab.22: Reaktionsansatz für einen Exo I / AAP Verdau	48
Tab.23: Temperaturprofil „Verdau“	48
Tab.24: MM für einen Cycle Sequenzierung Durchgang	49
Tab.25: Temperaturprofil „Cycle Sequenzierung“	49
Tab.26: Pufferzusammensetzung Dichtegradientenzentrifugation für 9 Gradienten	53
Tab.27: Entwässerungsreihe mit steigenden Alkoholkonzentrationen	55
Tab.28: Probanden- und Patienten-Zelllinien	56
Tab.29: Auflistung der verwendeten Abkürzungen	98

8.5. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt ...

Herrn *Prof. Dr. Bernhard Weber* für die Möglichkeit, diese spannende Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg durchführen und hierbei erste Einblicke im Bereich der Forschung gewinnen zu können. Vielen Dank für die Unterstützung beim Erlangen des Promotionsstipendiums, die umgehenden und ausführlichen Korrekturen, das Beantworten aller Fragen sowie das entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem danke ich dafür, dass ich im Rahmen des Forschungssemesters an lehrreichen Veranstaltungen wie „Lab-meetings“, „Journal Clubs“ und Tagungen teilnehmen durfte. Vor allem aber danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung des Stammzellprojekts.

Frau *Dr. Caroline Brandl* für die gewissenhafte und intensive Betreuung der Dissertation sowie die behutsame Einführung in die Laborarbeit. Vielen Dank für die in mich investierte Zeit und Mühe sowie die stetige theoretische und praktische Unterstützung, ohne die dieses aufwändige Projekt nicht möglich gewesen wäre. Einen großen Dank für die Hilfe bei allen Fragestellungen, die vertrauensvolle Arbeitsatmosphäre und die Motivation, die das Durchhalten während schwieriger Arbeitsphasen deutlich erleichtert hat.

Herrn *Prof. Dr. Charalampos Aslanidis* für die umgehende Bereitschaft, die Funktion des Zweitgutachters zu übernehmen.

Herrn *Michael Landthaler* für die Entnahme der Hautstanzen.

Frau *PD Dr. Charlotte M. Reiff* für die Bereitstellung der Zelllinie +/Q238R.

Frau *PD Dr. Marianne Federlin* für die Möglichkeit rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in Ihrem Institut anzufertigen.

Herrn *Prof. Dr. Achim Göpferich* und Frau *PD Dr. Miriam Breunig* für die Möglichkeit der konfokalen Mikroskopie am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie.

Frau *Dr. Johanna Käsbauer* für die Anfertigung, Auswertung und das zur Verfügung stellen der abgebildeten Karyogramme.

Frau *Andrea Milenkovic* für die Bereitstellung von hRPE-RNA sowie die Mithilfe bei den RPE-Fluoreszenzfärbungen und der ruhigen Hand beim Pipettieren des TaqMan HpSc Scorecard™ Panel.

Herrn *Dr. Vladimir Milenkovic* für die Einführung in die konfokale Mikroskopie und den kurzweiligen Beistand während stundenlanger Bildaufnahmen.

Herrn *Dr. Felix Grassmann* für die Unterstützung beim Planen und Durchführen der Fütterungsexperimente sowie für das Bereitstellen schon aufgearbeiteter POS.

Frau *Helga Ebensberger* und Frau *Gerlinde Ferstl* für die geduldige Mitarbeit beim Auffinden der schönsten Stellen unter dem Rasterelektronenmikroskop.

Frau *Martina Zimmermann* und Frau *Maya Fürstenau-Sharp* für wertvolle Ratschläge im Bereich der Stammzellforschung.

Herrn *Jürgen Kaschkötö* für die Hilfestellung bei allen technischen Fragen.

Frau *Kerstin Rückl* für die geduldige Laboreinführung und die große Hilfe gerade zu Beginn der Arbeit.

Frau *Kerstin Meier* für den praktischen und mentalen Beistand in allen Lebenslagen, die viele Geduld und die schöne Zeit auch außerhalb der Zellkultur.

Herrn *Christoph Meier* für die ausführlichen Erklärungen, das Mitwirken bei wiederholtesten Sequenzierungsansätzen und die netten Unterhaltungen im und um das Labor.

Frau *Sibylle Rosendahl* als PCR- und Paläontologie-Spezialistin für die theoretische und praktische Hilfe vor allem spät abends, wenn kaum noch jemand im Labor anzutreffen war. Danke auch für die Freundschaft, die hoffentlich noch lange anhält☺!

Ebenso danke ich allen nicht namentlich erwähnten ehemaligen KollegenInnen vom Institut für Humangenetik für die gute Zusammenarbeit, die lustigen Gespräche am Mittagstisch und vor allem für die schöne Zeit im Labor, die leider viel zu schnell vergangen ist.

Ein großes Dankeschön auch an meine Freunde und meine Familie, die mir während dieser Zeit in allen Lebenslagen beigestanden sind.

Ganz besonders danke ich jedoch meinen Eltern für das uneingeschränkte Verständnis, die praktische, finanzielle und mentale Unterstützung während des Studiums, der Zeit im Labor und während des Zusammenschreibens der Doktorarbeit. Danke, dass ihr mir mein Studium ermöglicht und auch in schwierigen Zeiten immer an meiner Seite gestanden habt! ☺

Diese Studie erhielt finanzielle Unterstützung durch die Novartis Pharma GmbH, Nürnberg (Referenznummer 3625340).